

Der PFKFB3 Genlocus als Zielstruktur des LOH 10p in Glioblastomen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von: Michael Fleischer
08.01.1982 in Stuttgart

Angefertigt im: Institut für Biochemie
Universität Leipzig, Medizinische Fakultät
Direktor Prof. Dr. med. Torsten Schöneberg

Betreuer: Prof. Dr. Klaus Eschrich
Dr. Renate Kessler

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
1 Bibliographische Beschreibung:	3
2 Abkürzungsverzeichnis.....	4
3 Einführung	5
3.1 Gliome.....	5
3.2 Gliomagenese	6
3.3 Verlust der Heterozygotie des Chromosoms 10 (LOH 10)	11
3.4 KLF6.....	13
3.5 PFKFB3	14
3.6 Spleißvarianten des PFKFB3-Gens.....	16
4 Ableitung der Fragestellung	19
5 Publikation.....	20
6 Zusammenfassung der Arbeit.....	32
7 Literaturverzeichnis	36
8 Anlagen.....	41
8.1 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	41
8.2 Curriculum Vitae	42
8.3 Publikationen	45
8.4 Danksagungen	46

1 Bibliographische Beschreibung:

Michael Fleischer

Der PFKFB3 Genlocus als Zielstruktur des LOH 10p in Glioblastomen

Universität Leipzig, 2012: Dissertation

46 S., 64 Lit., 3 Abb., 4 Anlagen.

Referat:

Ein LOH (loss of heterozygosity, Heterozygotieverlust) im Bereich des kurzen Arms des Chromosoms 10 tritt sehr häufig in hochgradigen Gliomen auf. Vornehmlich konzentriert sich der allele Verlust auf die Region 10p14-p15. Die chromosomale Instabilität dieser Region deutet auf die Existenz eines oder mehrerer Tumorsuppressorgene hin. Bis jetzt konnte der Krüppel-like Transkriptionsfaktor 6 (KLF6) als mögliche Zielstruktur eines LOH in 10p15 identifiziert werden. Das Gen des regulatorischen Glykolyseenzym PFKFB3 ist im Bereich 10p15.1 lokalisiert. Die Spleißvariante 4 (UBI2K4) des PFKFB3-Gens hat eine hemmende Wirkung auf das dreidimensionale Wachstum von U87 Glioblastomzellen. Folglich könnte der PFKFB3 Genlocus Zielstruktur eines LOH in Glioblastomen sein. In dieser Arbeit wurden 40 Glioblastome mit der Mikrosatellitenanalyse basierend auf PCR-Technik untersucht. Bei 55 % (22/40) der Glioblastome zeigte sich ein LOH des PFKFB3 Gens. Der LOH des KLF6 Locus, 2,5 cM telomerisch zur PFKFB3 lokalisiert, wurde in 60 % (21/35) der Glioblastome festgestellt und korrelierte nicht mit dem PFKFB3-LOH. Die Deletion eines Allels des PFKFB3-Gens führt zu einer signifikanten Abnahme der PFKFB3 mRNA- und Proteinkonzentration. Die Expression der das Glioblastomzellwachstum hemmenden Spleißvariante UBI2K4 war in der Gruppe der LOH PFKFB (+) Glioblastome deutlich erniedrigt im Vergleich zur PFKFB3-LOH (-) Gruppe und korrelierte mit der totalen PFKFB3 Expression. Die Prognose der Glioblastom-Patienten verschlechtert sich durch den PFKFB3-LOH und die daraus resultierende niedrigere UBI2K4 Expression. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass der für Glioblastome typische LOH der Region 10p14-p15 auf die PFKFB3 und speziell auf die Spleißvariante UBI2K4 als Tumorsuppressorprotein abzielt.

2 Abkürzungsverzeichnis

Bcl-2	B-Zell Lymphom-2 Protein
CDK4	Zyklin-abhängige Kinase 4
cM	Centimorgan
DMBT1	<i>Deleted in malignant brain tumors 1 protein</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
FGFR2	Fibroblastenwachstumsfaktor 2
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HIF-1	Hypoxieinduzierbarer Faktor 1
IDH1	Isocitratdehydrogenase 1
KLF6	<i>Krüppel like Factor 6</i>
LOH	Heterozygotieverlust
MDM2	<i>Mouse double minute gene 2</i>
MGMT	O-6-Methylguanin-Methyltransferase
MMCT	Mikrozellvermittelter Chromosomentransfer
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
mTOR	Mammalian target of rapamycin protein
NF1	Nukleärer Faktor 1
PDGF	<i>Platelet derived growth factor,</i>

PDGFR	<i>Platlet derived growth factor receptor</i>
PFK-1	6-Phosphofrukto-1-kinase
PFK-2/FBPase-2	6-Phosphofrukto-2-kinase/ Fruktose-2,6-bisphosphatase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PTEN	Phosphatase-Tensin-Homolog
RB1	Retinoblastomprotein 1
Si-RNA	<i>Small interfering</i> - Ribonuklerinsäure
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus
SSCP	Einzelstrangkonformationspolymorphismus
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TP53	Tumorsuppressorprotein 53
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation

3 Einführung

3.1 Gliome

Primäre Tumore des Zentralnervensystems stellen eine heterogene Gruppe benigner und maligner Neoplasmen dar. Gliome sind neuroepithelialen Ursprungs und machen ca. 70 % aller Tumore des ZNS im Erwachsenenalter aus. Darunter ist das Glioblastom die am häufigsten vorkommende und maligneste Form (Ohgaki und Kleihues, 2009).

Die Einteilung der Gliome erfolgt nach der Klassifikation von Tumoren des ZNS der World Health Organisation (WHO) (Louis et al., 2007), Diese umfasst die Histopathologie und ein darauf basierendes Grading-System der Gliome. Die histopathologische Einteilung erfolgt

anhand der morphologischen Ähnlichkeit zu dem entsprechenden Gliazelltyp, der Zytoarchitektur, immunhistochemischer Marker sowie des zytogenetischen Profils. Am häufigsten sind Astrozyten oder Oligodendrozyten Ursprung der Gliome, die folglich als Astrozytome bzw. Oligodendrogliome bezeichnet werden. Wenn Merkmale beider Gliazelltypen vorhanden sind, werden diese Entitäten als Oligoastrozytome klassifiziert (Westphal und Lamszus, 2011). Das WHO Grading-System für Gliome basiert auf den histologischen Merkmalen Zelldichte, Zellatypien, Mitoseindex, Nekrose und Vaskularisation. Es werden vier WHO Grade (I-IV) für astrozytäre Gliome unterschieden. Grad I Astrozytome (pilozytische Astrozytome) sind langsam wachsende gutartige Tumore ohne Tendenz zur Progression, die durch operative Maßnahmen therapiert werden können. Ebenfalls langsam wachsend sind Grad II Astrozytome, sie sind jedoch invasiv und bilden nach operativer Therapie Rezidive von gleicher oder höherer Malignität. Bei Grad III Astrozytomen findet sich ein schnelles Wachstum. Zudem weisen sie Zeichen von Anaplasie, Zellkernatypien und atypische Mitosen auf. Die operative Therapie wird häufig durch adjuvante Radio- und Chemotherapie ergänzt. Glioblastome (Grad IV) sind am stärksten entdifferenziert mit Nekrosen, Kernatypien und hoher mitotischer Aktivität, wachsen aggressiv und haben die schlechteste Prognose (Louis et al., 2007; Riemenschneider, 2009). Glioblastome werden aufgrund unterschiedlicher Entstehungswege und klinischer Kriterien in primäre und sekundäre Glioblastome eingeteilt. 90 % sind primären Ursprungs, bei denen kein Vorläufertumor nachweisbar ist. Daher werden sie auch als „*de novo*“ Glioblastome bezeichnet. Sie zeigen ein schnelles Wachstum mit kurzem klinischem Verlauf. Den verbleibenden Anteil machen sekundäre Glioblastome aus. Sie entstehen aus niedriggradigen, diffusen Astrozytomen (WHO Grad II), die eine Progression zu anaplastischen Astrozytomen (WHO Grad III) durchlaufen und sich in weiteren 5-10 Jahren zu Glioblastomen (Grad IV) entwickeln. Primäre Glioblastome treten vorwiegend bei älteren Patienten mit einem Altersdurchschnitt von 62 Jahren auf, während sekundäre Glioblastome eher bei jüngeren Patienten mit durchschnittlich 45 Jahren diagnostiziert werden (Ohgaki und Kleihues, 2009).

3.2 Gliomagenese

Gliome leiten sich von glialen Vorläuferzellen des neuroepithelialen Gewebes bzw. von neuroglialen Stammzellen ab, die in der subventrikularen Zone und im Gyrus dentatus die höchste Dichte aufweisen (Westphal und Lamszus, 2011; Maher et al., 2001). Die

Vorläuferzellen haben die Fähigkeit, initiiert durch Wachstumsfaktoren wie EGF (epidermal growth factor) und PDGF (platelet derived growth factor), vornehmlich in der weißen Substanz und entlang der Basalmembran der Gefäße durch das ZNS zu migrieren (Maher et al., 2001). Sie zeigen dabei eine diffuse Ausbreitung und treten praktisch in jedem Bereich des Gehirns auf. Dies erschwert die Therapie und erklärt die hohe Rezidivrate. Interessanterweise breiten sich Gliome nur im Gehirn aus und zeigen keine Metastasierung außerhalb des ZNS (Westphal und Lamszus, 2011).

Die Gliomagenese ist ein komplexer Prozess, bei dem eine Vielzahl von Veränderungen auf genomischer und zellphysiologischer Ebene stattfinden. Typisch sind der Verlust genetischer Informationen auf unterschiedlichen Chromosomen sowie die verstärkte Expression von Onkogenen. Genloci diverser Chromosomen, einschließlich des Y-Chromosoms, sind betroffen (Kanu et al., 2009). Der teilweise oder vollständige Verlust des Chromosoms 10 zählt mit 60-80 % zu den häufigsten genetischen Veränderungen in Glioblastomen (Vranova et al., 2007). Neben Gendosisverlusten, bedingt durch den vollständigen oder partiellen Verlust von Chromosomen, treten spezifische Deletionen innerhalb eines Chromosoms, inaktivierende Mutationen oder Veränderungen der DNA-Methylierung auf. In der Folge wird die Expression oder Aktivität von Proteinen mit Tumorsuppressoreigenschaften vermindert, einschließlich einer Reihe von Signalproteinen wie NF1, NF2, PTEN, Kinasen wie Caspase 8 und Zellzykluskontrollproteinen wie TP53, RB1, p14^{ARF} und p16^{INK4} (Kanu et al., 2009). Die verstärkte Expression von Onkogenen kann durch intra- oder extrachromosomale Amplifikationen oder aktivierende Mutationen entstehen. Am häufigsten kommt in Glioblastomen die Amplifikation des EGFR-Gens auf Chromosom 7 vor (Ruano et al., 2006). Außerdem findet man die Überexpression von Wachstumsfaktoren wie PDGF, VEGF und TGF sowie aktivierende Mutationen in Proteinen des PI3K-Signalweges (Westphal und Lamszus, 2011).

Onkogenetische Veränderungen können entweder direkt die Entstehung von Gliomen induzieren, wie durch Mutationen oder Deletionen von Proteinen der Zellzykluskontrolle, oder sie beeinflussen Wachstum und Funktionalität der Gliomzelle indirekt durch eine Erhöhung der DNA-Instabilität. Sehr häufig wird in Glioblastomen ein Aktivitätsverlust der O6-Methylguanin-Methyltransferase (MGMT) durch Methylierung der Promotorregion beobachtet. Die MGMT ist ein DNA-Reparaturenzym, das Zellen vor Mutationen, bedingt durch Alkylierung, schützt. Ein Verlust der MGMT ist überwiegend in sekundären

Glioblastomen zu beobachten und korreliert mit der Häufigkeit der Mutationen im *TP53*-Gen. Mutationen des *TP53*-Gens sind ein frühes Ereignis in der Pathogenese sekundärer Glioblastome (Nakamura et al., 2001; Westphal und Lamszus, 2011).

An der Entstehung von Gliomen sind die Aktivierung der durch Wachstumsfaktoren (z. B. EGFR, PDGFR) induzierten Tyrosinkinaserzeptor Signalwege und/oder die Inaktivierung von Signalwegen, die Zellzyklus, Zellwachstum und Apoptose kontrollieren, wesentlich beteiligt. Das betrifft vor allem den *TP53*–*MDM2*–*P14^{ARF}* Signalweg, den *RB1*–*p16^{INK4a}* Signalweg und den *PTEN*–*AKT*–*1-mTor* Signalweg (Abb. 1).

TP53 ist ein kurzlebiger Transkriptionsfaktor. DNA-Strangbrüche, die bei der Reaktion der Zelle auf endogenen und exogenen Stress entstehen, führen zur Hochregulation von *TP53* und über die Induktion der zyklinabhängigen Kinase *p21* zu einem Zellzyklusstopp. Die DNA-Schäden werden repariert und bei zu großen Defekten wird die Apoptose eingeleitet. *MDM2* hemmt die Aktivität des *TP53* über einen vermehrten Abbau. *P14^{ARF}* hemmt *MDM2* und führt so zu einer Stabilisierung von *TP53*. Ein Funktionsverlust des Signalweges, der mit einer Verstärkung der Zellproliferation einhergeht, kann durch *TP53*-Inaktivierung, Mutation oder Amplifikation des Regulatorproteins *MDM2* sowie durch Deletion oder Promotormethylierung des *P14^{ARF}* erfolgen (Ohgaki und Kleihues, 2009; Kanu et al., 2009).

Die Regulatorproteine *RB1* und *p16^{INK4a}* kontrollieren den Übergang der Zelle aus der G1-Phase in die S-Phase. Der G1/S-Übergang wird blockiert, indem *RB1* Transkriptionsfaktoren der *E2F*-Familie bindet und dadurch inhibiert. Wird *RB1* durch die zyklinabhängigen Kinasen *CDK4* und *CDK2* phosphoryliert, fällt die Hemmung von *E2F* weg und der Zellzyklus wird aktiviert. Die *CDK4* wiederum wird durch *P16^{INK4a}* in ihrer Funktion gehemmt, was zu einer Hemmung des G1/S Übergangs führt. Ein Funktionsverlust von *RB1* und *p16^{INK4a}* oder aktivierende Mutationen der *CDK4* führen über die Expression weiterer S-Phase Proteine und anti-apoptotischer Faktoren, wie *Bcl-2*, zu unkontrollierter Zellproliferation (Kanu et al., 2009; Ohgaki und Kleihues, 2009). *p16^{INK4a}* und *p14^{ARF}* sind Spleißvarianten des Genlocus *INK4a/ARF* auf 9p21. Ein Verlust dieses Gens beeinflusst sowohl den *TP53*- als auch den *RB1*-Signalweg und führt so zur Aufhebung der Kontrolle des Zellzyklus. Dieser Defekt tritt bei 50 % aller Glioblastome auf und ist die häufigste genetische Veränderung.

In der Signaltransduktion von EGFR findet sich *PTEN* als negativer Regulator von *AKT* bzw. Proteinkinase B. Verlust oder Mutation des *PTEN*-Gens führen im *PTEN*–*AKT*–*1-mTOR*–

Signalweg zu einer erhöhten Aktivität der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) und damit zu einer verstärkten Phosphorylierung von AKT, welches die Proliferation und das invasive Wachstum der Zellen fördert (Kanu et al., 2009; Ohgaki und Kleihues, 2009).

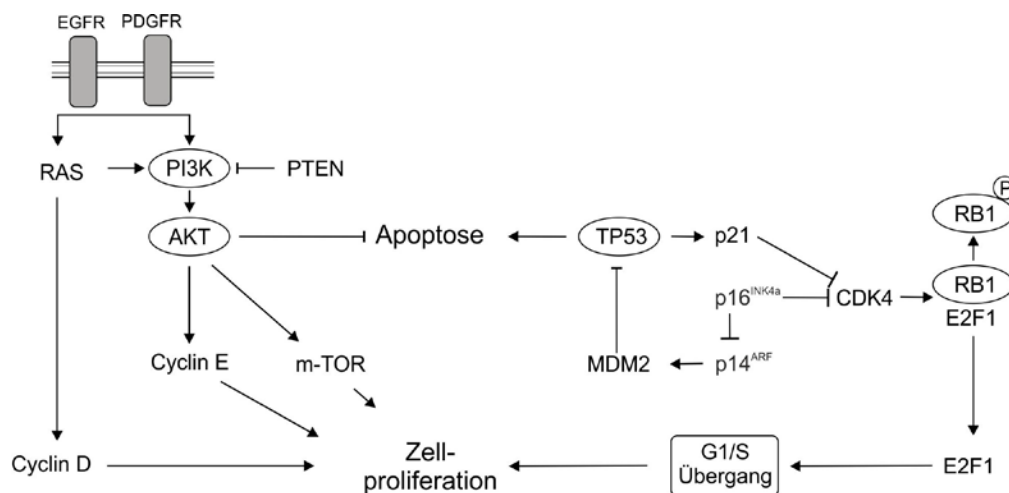


Abb. 1: Schematische Darstellung der Signalwege PTEN-AKT-1-mTOR, TP53-MDM2-P14ARF und RB1-p16INK4a (Gestaltet nach Kanu et al., 2009; Ohgaki und Kleihues, 2007; Riemenschneider und Reifenberger, 2009; Cancer Genome Atlas Research Network, 2008) Bei der Signaltransduktion, initiiert durch Wachstumsfaktoren wie EGF und PDGF, wird PI3K durch PTEN gehemmt. Ein Wegfall der Hemmung durch Deletion oder Mutation des PTEN-Gens bewirkt eine verstärkte Proliferation. Inaktivierung von TP53 und p14^{ARF}, sowie vermehrte Aktivität von MDM2 hemmen die Apoptose. Die Verminderung von p16^{INK4a} und p21 führt über die erhöhte Aktivität der CDK4 zur vermehrten RB1-Phosphorylierung und Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F1 und so zur Aufhebung des G1/S-Blockes.

Im Hinblick auf die primäre und sekundäre Genese der Glioblastome lassen sich für jeden Typ charakteristische Muster von Veränderungen und deren zeitliche Abfolge unterscheiden. Die EGFR-Überexpression tritt in etwa 40 % der primären Glioblastome auf und ist äußerst selten bei sekundären Glioblastomen zu finden (Watanabe et al., 1996). Mutationen im *PTEN*-Gen sind in 15-40 % der primären aber kaum in sekundären Glioblastomen zu finden. Inaktivierende TP53-Mutationen, ein frühes Ereignis in der Gliomagenese, kommen in zwei Dritteln aller sekundären Glioblastome vor, finden sich jedoch nur in einem Drittel der primären Glioblastome (Ohgaki et al., 2004). Die Hypothese unterschiedlicher genetischer Entstehungswege für primäre und sekundäre Glioblastome wird auch dadurch gestützt, dass sich die EGFR-Überexpression und TP53-Mutationen gegenseitig ausschließen (Watanabe et al., 1996). In sekundären Glioblastomen findet man häufiger eine Hypermethylierung des p14^{ARF}-Promotors als in primären Glioblastomen, während eine MDM2-Amplifikation ausschließlich in Gliomen primärer Genese ohne TP53-Mutationen vorkommt (Ohgaki und Kleihues, 2009). In der Progression von diffusen zu anaplastischen Astrozytomen tritt ein Verlust des Chromosoms 19q auf, der in der Hälfte der sekundären Glioblastome, allerdings nur selten (6 %) in primären Glioblastomen zu finden ist (Ohgaki und Kleihues, 2009).

Diese unterschiedlichen genetischen Muster ermöglichen eine Klassifikation von Glioblastom-Subtypen, die sich durch histologische Merkmale nicht unterscheiden. Von Parsons et al. wurden erstmals Mutationen im *Isocitratdehydrogenase 1 (IDH1)*-Gen bei Gliomen mit einer Häufigkeit von 12 % beschrieben (Parsons et al., 2008). Die *IDH1*-Mutation an Position R132 tritt in 70 % der WHO Grad II und III Astrozytome und in den daraus entstehenden sekundären Glioblastomen auf (Yan et al., 2009). Diese Mutation hat sich als guter Marker zur Differenzierung zwischen primären und sekundären Glioblastomen mit ansonsten gleichem Mutationsprofil erwiesen (Zhou et al., 2011).

Einzelne genetische Modifikationen in der Entwicklung von Glioblastomen lassen sich auch prognostisch nutzen. Im allgemeinen liegt die Prognose für Glioblastome nach Diagnosestellung und mit Therapie für beide Entstehungswege bei 7-15 Monaten mittlerer Überlebenszeit (Preusser et al., 2011). Allerdings gibt es innerhalb dieses Rahmens Unterschiede. In Hinblick auf die Genese zeigen Patienten mit sekundär entstandenen Glioblastomen ein deutlich längeres Überleben als Patienten mit primären Glioblastomen. Bei den genetischen Markern haben Patienten mit Glioblastomen, die eine *IDH1*-Mutation aufweisen, eine deutlich bessere Prognose als Patienten bei denen diese Mutation nicht

gefunden wurde (Hartmann et al., 2010). Dies gilt ebenso für Träger von Mutationen im *TP53*-Gen (Ohgaki et al., 2004). Das Vorhandensein von Methylierungen im Promotor der *MGMT* verbessert das Ansprechen der Glioblastome auf alkylierende Therapeutika durch eine verminderte DNA Reparaturkapazität und wirkt sich so positiv auf das Überleben der Patienten aus (Preusser et al., 2011; Riemenschneider, 2009). Daneben gelten als signifikante prädiktive Faktoren histologische Kriterien wie das Vorhandensein von Nekrosen für eine schlechtere oder oligodendrogliale Anteile im Tumor für eine bessere Prognose (Ohgaki und Kleihues, 2005). Das Alter der Patienten ist der bedeutendste prognostische Faktor. So haben Patienten unter 50 Jahren eine fast doppelt so hohe Überlebensrate wie Patienten oberhalb des 50. Lebensjahrs. In Bezug auf die Geschlechtszugehörigkeit treten primäre Glioblastome vermehrt bei Männern auf (Ohgaki, 2009; Kleihues und Ohgaki, 1999).

3.3 Verlust der Heterozygotie des Chromosoms 10 (LOH 10)

In der Pathogenese von Glioblastomen kommt es in den verschiedenen Entwicklungsstufen zum partiellen oder vollständigen Verlust der Heterozygotie von Chromosomen. Die Entstehungsmechanismen umfassen spontane Mutationen, Genkonversion, interstitielle Deletion, mitotische Non-Disjunction und Translokationen von chromosomalen Abschnitten. Diese Ereignisse führen zur Eliminierung von Tumorsuppressorgenen und stellen einen Wachstumsvorteil für die Tumoren dar (Couto, 2011).

Der partielle oder vollständige LOH des Chromosoms 10q ist mit 60-80 % die häufigste chromosomale Veränderung in beiden Glioblastomsubtypen (primär und sekundär). Es sind vor allem die Regionen 10q23-q24 (*PTEN*) und 10q25-qter (*DMBT1*, *FGFR2*) betroffen. Der LOH 10q25-qter nimmt von niedriggradigen über anaplastische Astrozytome bis hin zu hochgradigen Glioblastomen zu, was auf das Vorhandensein von Tumorsuppressorgenen in dieser Region schließen lässt, deren Eliminierung die Tumorprogression fördert (Rasheed et al., 1995; Ohgaki und Kleihues, 2009; Fujisawa et al., 2000). Das Auftreten des LOH 10q ist mit einer kürzeren Überlebenszeit der Patienten assoziiert (Ohgaki et al., 2004).

Der Verlust von genetischer Information auf dem kurzen Arm des Chromosoms 10 tritt in über 50 % aller Glioblastome, vornehmlich jedoch bei der primären Form, auf und ist, im Gegensatz zum LOH 10q, sehr heterogen (Fujisawa et al., 2000; Hata et al., 2006). Durch intensive Kartographierung mit Hilfe der Mikrosatellitenanalyse (Kimmelman et al., 1996;

Voesten et al., 1997; Ichimura et al., 1998) und durch die Analyse der Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNP) mit der SSCP-Methode (Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse) (Hata et al., 2006) konnten drei Regionen in 10p14-p15 und eine Region in 10p13 identifiziert werden, in denen ein LOH vermehrt auftritt (Abb. 2). Die chromosomale Instabilität von 10p in diesen Bereichen weist auf die Existenz mehrerer Tumorsuppressorgene hin. Kon et al. untermauerten den Befund, indem sie chromosomale Fragmente von 10p14 und 10p15 in humane T98G Glioblastomzellen durch Transfektion mittels MMCT-Technik einbrachten. Es kam, im Vergleich zu den ursprünglichen T98G-Zellen, zur Suppression der Koloniebildung der transfizierten Zellen in Softagar (Kon et al., 1998).

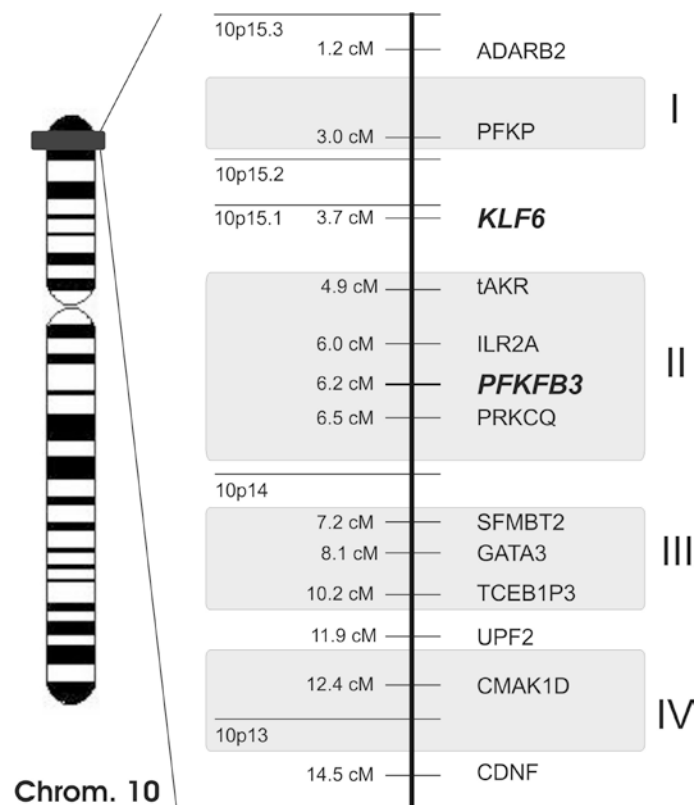


Abb. 2: Darstellung der Region 10p13-p15.3 mit verschiedenen Genloci. I-IV: häufig durch LOH deletierte Regionen; *ADARB2*, Adenosindesaminase RNA-spezifisches Gen B2; *PFKP*, 6-Phosphofrukto-1-kinase, P-Typ; *KLF6*, Krüppel-like factor 6; *tAKR*, Aldoketoreduktase, verkürzte Form; *IL2RA*, Interleukin 2-Rezeptor alpha; *PFKFB3*, 6-Phosphofrukto-2-kinase/Fruktose-2,6-bisphosphatase 3; *PRKCQ*, Proteinkinase C-theta; *SFMBT2*, SCM-like gene 2 mit vier mbt Domainen; *GATA3*, GATA Bindungsprotein 3; *TCEB1P3*, Transkriptionselongationsfaktor B, Polypeptid 1-Pseudogene 3; *UPF2*, Regulator des Abbaus von nonsense-Transkripten; *CMAK1D*, Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase 1D; *CDNF*, cerebraler Dopamin neurotrophischer Faktor.

3.4 KLF6

Jeng und Hsu beschrieben den Transkriptionsfaktor KLF6 in 10p15.1 als mögliches Kandidatengen für einen LOH auf 10p (Jeng und Hsu, 2003). KLF6 gehört zur Familie der Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren und wird ubiquitär exprimiert. Er induziert u. a. den Inhibitor zyklinabhängiger Kinasen p21 im TP53-Signalweg, beeinflusst die Zyklin D1/CDK4 Wechselwirkung in der RB1-Kaskade, hemmt das c-Jun Proto-Onkoprotein und verhindert so ein überschießendes Wachstum von Zellen (Narla et al., 2001). Inaktivierende Mutationen, die Hypermethylierung des Promotors und der allele Verlust des *KLF6*-Gens wurden in verschiedenen Krebsarten, wie kolorektales Karzinom, Nasopharynxkarzinom, Prostatakarzinom und hepatozelluläres Karzinom, beschrieben (Reeves et al., 2004; Chen et al., 2002; Chen et al., 2003; Lee et al., 2010).

In Glioblastomen wurden ebenfalls sowohl der LOH als auch Mutationen des *KLF6*-Gens nachgewiesen (Jeng und Hsu, 2003). Die Rolle des KLF6 als mögliches Tumorsuppressorgen in astrozytären Gliomen wird jedoch kontrovers diskutiert. So konnten Montanini et al. (2004) und Yin et al. (2007) nur vereinzelt einen LOH bzw. Mutationen des *KLF6*-Gens in Glioblastomen nachweisen, die sich nicht unbedingt auf die Funktionalität des Transkriptionsfaktors auswirkten (Montanini et al., 2004; Yin et al., 2007). Allerdings fanden Yin et al. eine deutlich erniedrigte KLF6-Expression in Glioblastomen im Vergleich zu normalem Hirngewebe (Yin et al., 2007). Camacho-Venegas et al. (2007) beschrieben die Expression einer zytoplasmatischen Spleißvariante des *KLF6*-Gens (*KLF6*-SV1), die den

hemmenden Effekt von KLF6 auf die Proliferation antagonisiert und so eine onkogenetische Wirkung hat (Camacho-Vanegas et al., 2007). Es ist noch offen, welche Bedeutung dem KLF6 in der Gliomagenese zukommt und ob er die primäre Zielstruktur des LOH auf 10p darstellt. Die Existenz weiterer Kandidatengene mit Tumorsuppressoreigenschaften konnte bis jetzt in der Region 10p14-p15 nicht nachgewiesen werden.

3.5 PFKFB3

Das Gen *PFKFB3* ist auf 10p15.1 lokalisiert. Es kodiert das bifunktionelle Enzym 6-Phosphofrukto-2-kinase/Fruktose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2, EC 2.7.1.105/ EC 3.1.3.46; Mahlknecht et al., 2003; Manzano et al., 1998). Die PFK-2/FBPase-2 katalysiert die Synthese und den Abbau von Fruktose-2,6-bisphosphat (Fru-2,6-P₂) und ist so für die intrazelluläre Konzentration dieses Signalmoleküls verantwortlich (Okar und Lange, 1999). Fru-2,6-P₂ ist der stärkste allosterische Aktivator der 6-Phosphofrukto-1-kinase (PFK-1, EC 2.7.1.11), eines Schrittmacherenzym der Glykolyse, und der wirksamste Inhibitor der Fruktose-1,6-bisphosphatase in der Gluconeogenese. Die PFK-2/FBPase-2 kontrolliert über den Fru-2,6-P₂ Spiegel den glykolytischen Fluss in eukaryotischen Zellen (Okar et al., 2001). Im Menschen gibt es vier Isoenzyme der PFK-2/FBPase-2, die von vier unabhängigen Genen, *PFKFB1-4*, kodiert werden (Rider et al., 2004).

Das Enzym PFKFB1 kommt in der Leber und im Skelettmuskel vor. Die PFKFB2 wird vornehmlich im Herzmuskel und die PFKFB4 im Hoden exprimiert. Die PFKFB3 findet sich ubiquitär in allen humanen Geweben und wurde zuerst aus Plazentagewebe isoliert. Daher wird sie auch als plazentare PFK-2 bezeichnet (Sakakibara et al., 1997). Synonyme sind ubiquitäre PFK-2 (uPFK-2; Manzano et al., 1998; Kessler und Eschrich, 2001) und induzierbare PFK-2 (iPFK-2; Chesney et al., 1999), deren cDNAs aus humanem fetalen Hirngewebe (uPFK-2) bzw. Skelettmuskel (iPFK-2) kloniert wurden. Die Isoenzyme PFKFB1-4 zeigen eine hohe Homologie ihrer katalytischen Domänen, haben jedoch spezifische kinetische und regulatorische Eigenschaften (Okar und Lange, 1999). Sie unterscheiden sich im Kinase:Bisphosphatase-Aktivitätsverhältnis, das in Abhängigkeit von äußeren Stimuli durch metabolische Effektoren und Phosphorylierung/Dephosphorylierung des Enzymproteins verändert werden kann (Okar et al., 2001). Die PFKFB3 hat im Vergleich

zu den anderen Isoenzymen mit 740:1 den höchsten Kinase:Bisphosphatase-Aktivitätsquotienten (Chesney et al., 1999).

Als Besonderheit besitzt die mRNA der PFKFB3 ein AU-reiches Element in der 3'-untranslatierten Region, das mehrfache Kopien einer AUUUA-Sequenz enthält. Das AUUUA Motiv ist typisch für die mRNAs von Protoonkogenen und proinflammatorischen Zytokinen. Es verleiht ihnen Instabilität und führt zu einer verstärkten Translationsaktivität (Cole und Mango, 1990). Die PFKFB3 kann, wie viele Protoonkogene und Zytokine, durch Entzündungsstimuli, z. B. Lipopolysaccharide, induziert werden (Chesney et al., 1999). Zudem wird die PFKFB3 durch Insulin und Progesteron verstärkt exprimiert (Riera et al., 2002; Hamilton et al., 1997).

Unter hypoxischen Bedingungen stellen Zellen die aerobe Energieproduktion auf anaerobe Glykolyse um, was als Pasteur-Effekt bekannt ist (Krebs, 1972). Dabei wird die Expression von Glykolyseenzymen und Glukosetransportern hochreguliert. PFKFB1-4 sind an der Anpassung maßgeblich beteiligt. Durch hypoxische Reize wird die Expression aller vier PFKFB-mRNAs induziert, wobei die PFKFB3-mRNA am stärksten hochreguliert wird. Die PFKFB3 wird direkt über den HIF-1-Signaltransduktionsweg reguliert. (Minchenko et al., 2003; Minchenko et al., 2002).

Die Isoenzyme der PFKFB1-4 werden in Säugetiergeweben und proliferierenden Zellen koexprimiert. Jedem der Isoenzyme kommt vermutlich eine spezifische Funktion bei der Anpassung des Fru-2,6-P₂-Spiegels an unterschiedliche physiologische Bedingungen oder hormonelle Stimuli zu (Minchenko et al., 2003; Telang et al., 2006). Der Nachweis, dass in *ras*-transformierten Fibroblasten von heterozygoten PFKFB3^{+/-} Mäusen die Fru-2,6-P₂-Konzentration, trotz Koexpression der Isoenzyme 1-4, auf einem niedrigen Level bleibt, zeigt, dass die hohe Kinaseaktivität der PFKFB3 nicht durch die anderen Isoenzyme zu ersetzen und die PFKFB3 deshalb vorrangig für die Regulation der Glykolyse in diesen Zellen verantwortlich ist (Telang et al., 2006).

In Tumorzellen werden eine hohe Konzentration des Signalmetaboliten Fru-2,6-P₂ und in der Folge ein erhöhter glykolytischer Fluss beobachtet (Nissler et al., 1995; Bosca et al., 1986). Die gesteigerte Tumorglykolyse lässt sich auch bei normalem Sauerstoffangebot nachweisen, ein Phänomen das als Warburg-Effekt bezeichnet wird (Warburg, 1956). Die PFKFB3-Expression ist in malignen Tumoren der Brust, des Ovars, des Kolons und der Schilddrüse im

Vergleich zum angrenzenden Normalgewebe deutlich erhöht (Atsumi et al., 2002). Auch in Glioblastomen findet eine hohe aerobe Glykolyse statt (Lohle et al., 1998). Glioblastome exprimieren neben der PFKFB3 auch die Isoenzyme PFKFB2 und 4. Die PFKFB3-mRNA ist in niedriggradigen Astrozytomen (WHO Grad I/II) im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe erhöht. Mit zunehmender Malignität der Astrozytome nimmt die PFKFB3-Expression wieder ab. Der PFKFB3-mRNA-Spiegel in hochgradigen Astrozytomen (WHO III/IV) liegt auf dem Niveau von normalem Hirngewebe. Die PFKFB3-Proteinkonzentration ist jedoch infolge einer Translationsaktivierung in hochgradigen Astrozytomen signifikant höher als in niedriggradigen (Kessler et al., 2008). Ein besonders hoher PFKFB3-Spiegel wird in der S-Phase des Zellzyklus beobachtet (Atsumi et al., 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der PFKFB3 in COS-Zellen zu einer verstärkten Zellproliferation führt (Bando et al., 2005). Anti-Sense Oligonukleotide gegen die PFKFB3 hemmen Glykolyse und Proliferation von K562 Leukämiezellen und vermindern das Tumorstadium *in vivo* bei K562-infizierten Mäusen (Chesney et al., 1999). Die Befunde deuten darauf hin, dass die PFKFB3 auch eine regulatorische Funktion in der Kontrolle der Zellproliferation hat.

3.6 Spleißvarianten des PFKFB3-Gens

Nachdem Watanabe et al. im Hirngewebe der Ratte acht Spleißvarianten des *PFKFB3*-Gens nachweisen konnten (Watanabe und Furuya, 1999), gelang es Kessler et al. analog dazu sechs Spleißvarianten der PFKFB3 in humanem Hirngewebe zu identifizieren. Sie entstehen durch alternatives Spleißen von 7 Exons in der C-terminalen Region der PFKFB3 und werden als UBI2K1-6 bezeichnet (Abb. 3; Kessler und Eschrich, 2001). Die Sequenz der UBI2K5 ist identisch mit der von Manzano et al. als uPFK-2 beschriebenen. Die UBI2K4 entspricht der von Chesney et al. entdeckten iPFK-2 (Chesney, et al., 1999).

Die Expression der Spleißvarianten ist gewebsspezifisch. In der Muskulatur findet man vor allem die UBI2K4, während in der Leber die UBI2K5 und UBI2K6 dominieren. Das PFKFB3-Spleißmuster in humanem Hirngewebe ist deutlich heterogener als in Muskel- oder Lebergewebe. Es werden überwiegend die Spleißvarianten UBI2K3-6 exprimiert. Die Konzentration der UBI2K5 ist im Vergleich zu den anderen Spleißformen am höchsten. UBI2K1 und UBI2K2 sind kaum nachweisbar. Die UBI2K3 ist eine hirnspezifische Spleißvariante (Kessler und Eschrich, 2001).

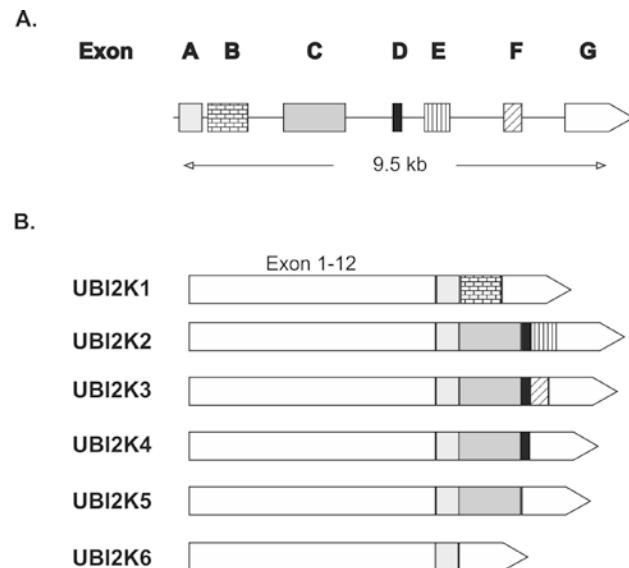


Abb. 3:Schematische Darstellung der PFKFB3 Spleißvarianten UBI2K1-6. A. Variable Region des PFKFB3-Gens bestehend aus 7 Exons A-G. B. Vergleich der mRNA der Spleißvarianten UBI2K1-6, die sich auf Proteinebene im C-terminalen Bereich unterscheiden. Die Exons 1-12 sowie A und G sind in allen Spleißvarianten vorhanden. Exon D findet sich nur in UBI2K2-4. Die Exons B, E und F sind spezifisch für nur jeweils eine Spleißvariante.

Die Progression der astrozytären Gliome ist mit einer Veränderung des PFKFB3-Spleißmusters verbunden. Niedriggradige Astrozytome (WHO Grad I/II) exprimieren, wie normales Hirngewebe, die Spleißvarianten UBI2K3-6, wobei UBI2K5 überwiegt. In hochgradigen Astrozytomen (WHO Grad III/IV) sind hauptsächlich UBI2K5 und UBI2K6 zu finden. Die UBI2K4-mRNA Konzentration nimmt mit steigender Malignität der Astrozytome deutlich ab. Die UBI2K3 ist in Glioblastomen nicht nachweisbar (Zscharnack et al., 2009).

Die Funktionen der einzelnen Spleißvarianten innerhalb des Zellstoffwechsels sind nur teilweise bekannt. Die Überexpression der UBI2K4, UBI2K5 oder UBI2K6 in U87-Glioblastomzellen führt, wie erwartet, zu erhöhten intrazellulären Fru-2,6-P₂-Konzentrationen. Allerdings erhöht nur die Überexpression von UBI2K5 und UBI2K6 die Laktatkonzentration und die Glykolysegeschwindigkeit (Zscharnack et al., 2009). Ein Knock-down der Spleißvariante UBI2K5 mit si-RNA in HeLa-Zellen (humane, cervikale Adenokarzinomzellen) verringert zum einen die glykolytische Aktivität, zum anderen wird

das dreidimensionale Wachstum der Zellen gehemmt. Dabei verbleiben die Zellen vermehrt im G0/G1 Stadium mit vermindertem Übergang zur S-Phase des Zellzyklus (Calvo et al., 2006).

Die C-terminale Domäne der Spleißvariante UBI2K5 enthält ein Translokationssignal (KKRP) für den Übertritt in den Zellkern. In HeLa-, HCT116- und MDA-MB-231-Zellen konnte die UBI2K5 im Nukleus nachgewiesen werden. Die Spleißvariante produziert dort Fru-2,6-P₂, welches allerdings nicht zur verstärkten zellulären Glykolyse führt. Vielmehr wird durch die ektopische Expression der UBI2K5 die Expression der Zellzykluskontrollproteine CdK1, Cdc25C und Cyclin D3 induziert, der Zellzyklusinhibitor p27 wird durch Phosphorylierung inaktiviert und die Zellproliferation so gesteigert (Yalcin et al., 2009).

Interessanterweise führt die Überexpression der Spleißvariante UBI2K4 in U87-Zellen zu einer Wachstumshemmung von fast 50 %. Die Überexpression der UBI2K5 und UBI2K6 hat keinen Effekt auf das Wachstum von U87-Zellen. Die UBI2K4-mRNA Konzentration zeigt eine inverse Korrelation mit der Wachstumsgeschwindigkeit verschiedener Tumorzelllinien: langsamer wachsende Tumorzelllinien wie EPLC-272H Lungenkarzinom- und LN405-Glioblastomazellen, haben einen höheren UBI2K4-Level als schneller wachsende Tumorzelllinien, wie HeLa-, Cervixkarzinom- und PC3-Prostatakarzinomzellen (Zscharnack et al., 2009). Aufgrund ihrer proliferationshemmenden Eigenschaften kann die Spleißvariante UBI2K4 als Tumorsuppressorprotein angesehen werden. Die PFKFB3-Spleißvarianten UBI2K4 und UBI2K5 haben neben ihrer regulatorischen Rolle in der Glykolyse auch einen Einfluss auf die Wachstumskontrolle von Tumorzellen, so dass die PFKFB3 eine Verbindung zwischen Energiestoffwechsel und Zellproliferation herstellt (Chesney, 2006).

4 Ableitung der Fragestellung

Bei der Pathogenese primärer und sekundärer Glioblastome kommt es zu spezifischen Veränderungen auf genomischer Ebene, die zur Deletion von Tumorsuppressorgenen und/oder zur Amplifikation von Onkogenen führen. Dabei sind häufig Kontrollmechanismen des Zellstoffwechsels betroffen, die für Wachstum, Invasivität und Vaskularisierung verantwortlich sind. Bei Glioblastomen findet man im Bereich des Chromosoms 10p eine erhöhte Frequenz des Verlusts genetischen Materials, vor allem in der Region 10p14-p15, was die Anwesenheit eines oder mehrerer Tumorsuppressorgene vermuten lässt. In dieser Region befindet sich der Genlocus des glykolytischen Regulatorproteins PFKFB3. Die Spleißvariante UBI2K4 der PFKFB3 zeigt Tumorsuppressoreigenschaften, indem sie das Wachstum von U87-Glioblastomzellen hemmt. Als weiteres Tumorsuppressorgen in dieser Region wird der Transkriptionsfaktor KLF6 diskutiert, der unter anderem einen negativen Effekt auf die Zellproliferation hat.

Folgende Fragen lassen sich für die vorgelegte Arbeit ableiten.

1. Wie häufig tritt ein LOH des PFKFB3-Genlocus in der Region 10p14-p15 in Glioblastomen auf? Wie beeinflusst der PFKFB3 LOH die PFKFB3-mRNA und Proteinkonzentration? Korreliert der PFKFB3-LOH mit einer verminderten Expression des PFKFB3-Genprodukts?
2. Wie häufig tritt ein Verlust des KLF6-Genlocus in Glioblastomen auf? Korreliert der KLF6-LOH mit dem PFKFB3-LOH bzw. mit der PFKFB3-Expression?
3. Besteht eine Korrelation zwischen dem PFKFB3-LOH und der Expression der Spleißvariante UBI2K4? Verhalten sich PFKFB3- und UBI2K4-Expression zueinander proportional?
4. Hat der PFKFB3-LOH einen Einfluss auf die Prognose der Glioblastom-Patienten? Besteht ein Zusammenhang zwischen der Expression des Tumorsuppressorproteins UBI2K4 und der Überlebenszeit der Patienten?

5 Publikation

Title: LOH on 10p14-p15 targets the PFKFB3 gene locus in human glioblastomas

Author(s): Fleischer M, Kessler R, Klammer A, Warnke JP, Eschrich K.

Source: Genes, Chromosomes & Cancer, Volume 50, Issue 12, Pages 1010-1020

Published: December 2011

Times Cited: 1

References: 43

Language: English

Publisher: John Wiley & Sons Inc.

PubMed ID: 21987444

ISSN: 1098-2264

DOI: 10.1002/gcc.20914

Impact Factor (2011): 3,99

LOH on 10p14-p15 Targets the *PFKFB3* Gene Locus in Human Glioblastomas

Michael Fleischer,¹ Renate Kessler,¹ Angelika Klammer,² Jan-Peter Warnke,² and Klaus Eschrich^{1*}

¹Institute of Biochemistry, Medical Faculty, University of Leipzig, Leipzig, Germany

²Department of Neurosurgery, Paracelsus Hospital, Zwickau, Germany

Loss of heterozygosity (LOH) on chromosome arm 10p is very common in high-grade gliomas and is, among others, concentrated on the region 10p14-p15. Presence of multiple tumor suppressor genes is assumed, but until now only Krüppel-like transcription factor 6 (*KLF6*) has been suggested as possible target of LOH in this region. On the basis of the fact that the splice variant 4 (*UBI2K4*) of the *PFKFB3* gene, located in 10p15.1, inhibits the anchorage-independent growth of U87 glioblastoma cells, we hypothesized that *PFKFB3* is a target gene of LOH in glioblastomas. In this study, we analyzed 40 glioblastomas for LOH in 10p15, including the *PFKFB3* and *KLF6* loci, by PCR-based microsatellite analysis. We detected LOH of *PFKFB3* in 55% (22/40) of glioblastomas. LOH of *KLF6*, mapped 2.5 cM telomerically to the *PFKFB3* locus, was not stringently correlated to the *PFKFB3* LOH. The allelic deletion of *PFKFB3* resulted in a decrease of *PFKFB3* mRNA level accompanied by a lower *PFKFB3* protein level. The expression of growth-inhibiting splice variant *UBI2K4* was effectively reduced in glioblastomas with *PFKFB3* LOH and a positive correlation with overall *PFKFB3* expression was observed. The *PFKFB3* LOH as well as the resulting low *UBI2K4* expression level was associated with a poor prognosis of glioblastoma patients. We conclude that LOH on 10p14-p15 in glioblastomas targets *PFKFB3* and in particular splice variant *UBI2K4*, a putative tumor suppressor protein in glioblastomas. © 2011 Wiley Periodicals, Inc.

INTRODUCTION

Glioma is the most frequent primary brain tumor within the space-occupying intracranial lesions. Gliomas arise from glial cells or glial precursor cells. They are classified according to histological criteria of WHO and grouped into Grades I–IV (Louis et al., 2007). Glioblastoma (Grade IV), the most common and aggressive form of all neuroepithelial tumors (Ohgaki and Kleihues, 2005), develop either de novo as primary glioblastoma or through progression from low-grade or anaplastic astrocytoma (secondary glioblastoma). During these processes, chromosomal aberrations and mutations in tumor suppressor genes occur.

The two types of glioblastoma develop through different genetic pathways. Primary glioblastoma exhibit frequent *EGFR* amplification, *CDKN2A* deletion, and *PTEN* mutations (Ohgaki and Kleihues, 2007). Secondary glioblastoma are characterized by mutations in the *TP53* tumor suppressor gene and isocitrate dehydrogenase1 (*IDH1*) genes and also by promoter methylation of the *RB1* gene (Ohgaki and Kleihues, 2007; Riemenschneider and Reifenberger, 2009). Loss of heterozygosity (LOH) on the long arm of chromosome 10 is the most frequent chromosomal

aberration in both subtypes of glioblastoma (60–80% of cases). Commonly deleted loci are 10q23-q24 (*PTEN*) and 10q25, harboring several tumor suppressor genes (Rasheed et al., 1995; Ohgaki and Kleihues, 2009). LOH on 10p occurs in about 50% of glioblastomas and is largely restricted to primary glioblastoma (Fujisawa et al., 2000). Fine mapping of 10p using microsatellite analysis revealed at least four regions (I–IV) in the telomeric part of 10p (Fig. 1), which are commonly lost (Kimmelman et al., 1996; Voesten et al., 1997; Ichimura et al., 1998). Hata et al. (2006) found by single-strand conformation polymorphism analysis that the region on 10p14-p15 is frequently deleted in glioma. Kon et al. (1998) introduced chromosomal fragments of 10p into the human glioblastoma cell line T98G and observed an efficient suppression of colony-forming ability in hybrid clones with fragments covering 10p15 and a portion of 10p14. These findings suggest that multiple tumor suppressor

*Correspondence to: Klaus Eschrich, Institute of Biochemistry, Medical Faculty, University of Leipzig, Johannisallee 30, D-04103 Leipzig, Germany. E-mail: eschrich@uni-leipzig.de

Received 23 March 2011; Accepted 6 July 2011

DOI 10.1002/gcc.20914

Published online 30 August 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

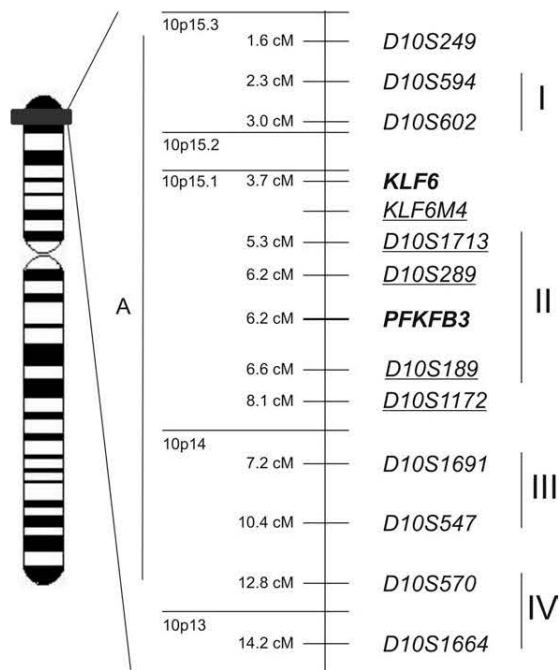


Figure 1. Map of chromosome 10 representing microsatellite markers on 10p13-p15, and the *PFKFB3* and *KLF6* loci. Vertical bars indicate commonly lost regions (I-IV) in human gliomas as described in the literature (Kimmelman et al., 1996; Voesten et al., 1997; Ichimura et al., 1998; Hata et al., 2006). Region A indicates the chromosomal segment necessary for suppressor activity in T98G glioblastoma cells (Kon et al., 1998). Markers used for LOH analysis in this study are underlined.

genes exist on 10p14-p15. Recently, *KLF6* (Krüppel-like transcription factor 6), mapped to 10p15.1, was discussed as a target of LOH on 10p in glioblastoma (Jeng and Hsu, 2003; Montanini et al., 2004; Camacho-Vanegas et al., 2007). Until now, no further candidate tumor suppressor genes at this locus have been identified.

The *PFKFB3* gene maps to 10p15.1 and codes for a bifunctional enzyme, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2; EC 2.7.1.105/ EC 3.1.3.46) (Manzano et al., 1998; Mahlknecht et al., 2003). PFK-2/FBPase-2 is a key regulatory enzyme of glycolysis, forming and degrading the signal molecule fructose-2,6-bisphosphate (Fru-2,6-P₂). Fru-2,6-P₂ is a positive allosteric effector of 6-phosphofructo-1-kinase (EC 2.7.1.11), a rate-limiting enzyme of glycolysis. By altering the Fru-2,6-P₂ level, PFK-2/FBPase-2 controls the glycolytic flux in eukaryotic cells (Van Schaftingen et al., 1981; Okar et al., 2001). In mammals, four different PFK-2/FBPase-2 isoenzymes are expressed, encoded by four independent genes, *PFKFB 1-4* (Rider et al., 2004). The *PFKFB3* gene product was shown to

be activated by hypoxic, mitogenic and inflammatory stimuli. The *PFKFB3* mRNA contains an AUUUA instability element, which is found in mRNAs of inflammatory cytokines and protooncogenes of the early response gene family (Chesney et al., 1999). Of all four isoenzymes, *PFKFB3* has the highest kinase/bisphosphatase activity ratio and demonstrates the highest induction through the HIF-1 pathway (Minchenko et al., 2003; Yalcin et al., 2009a).

Since Warburg (1956) it is known that in cancer cells a high rate of glycolysis is maintained, despite the presence of oxygen. Several findings show that *PFKFB3* is over-expressed in different human cancers including malignant glioma and might be an essential source of increased Fru-2,6-P₂ and high glycolic flux in tumor cells (Atsumi et al., 2002; Kessler et al., 2008).

Alternative splicing of the C-terminal region of *PFKFB3* leads to expression of six different isoforms designated UBI2K1-6 (Kessler and Eschrich, 2001). The *PFKFB3* splice patterns are tissue-specific and point to a certain role of each splice variant in metabolism (Watanabe and Furuya, 1999). The splice variant 5 (*UBI2K5*), also referred to as uPFK-2 or PFKFB3-ACG, is predominantly expressed in transformed and proliferating cells. Silencing of splice variant 5 has been reported to reduce glycolytic activity and proliferation of HeLa cells (Calvo et al., 2006). Yalcin et al. (2009b) found evidence that splice variant 5 has the ability to translocate into the nucleus of HeLa cells and to activate cyclin-dependent kinase-1 (Cdk-1) via Fru-2,6-P₂ resulting in stimulation of cell proliferation. In contrast, overexpression of splice variant 4 (*UBI2K4*) impedes the growth of U87 glioblastoma cells and the expression level of *UBI2K4* is inversely related to the growth rate of human cancer cell lines of different origin (Zscharnack et al., 2009).

In this study, we examined LOH on 10p15.1 in 40 glioblastomas and related it to expression levels of total *PFKFB3* and of splice variant 4 (*UBI2K4*). We show that the *PFKFB3* locus is a target of LOH in human glioblastomas.

MATERIAL AND METHODS

Tumor and Blood Samples

Tumor and blood samples were collected from patients undergoing standard image guided micro-neurosurgical tumor-resection at the Department of Neurosurgery of Paracelsus

Hospital Zwickau (Zwickau, Germany). Specimens from 40 patients suffering from glioblastoma were used in this study. The histological diagnosis was provided by Dr. Petrow (Institute for Pathology, Zwickau) according to the WHO classification criteria (Louis et al., 2007). Two glioblastomas (Cases 27 and 40) were diagnosed as secondary glioblastomas with evidence of preceding low-grade or anaplastic glioma. If possible, two samples from the tumor center and one sample from the marginal region of each tumor were examined. As control, six samples of cortical brain tissue were obtained from access preparation in the course of neurosurgical operation and verified as non-neoplastic brain tissue according to histological criteria (Zscharnack et al., 2009). The ethics committee of University of Leipzig approved this study (Reg.-No. 191/2002).

DNA, RNA, and Protein Isolation

The DNA from the blood samples was isolated with Qiaamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The tissue specimens were homogenized on ice and total RNA was prepared using the Trizol reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) according to manufacturer's instructions. The remaining lower ethanol chloroform phase and the interphase were used for DNA and protein extraction following the manufacturer's protocol. Proteins were dissolved in 1% (w/v) SDS and protein concentrations were determined using the DC Protein Assay (Bio-Rad, München, Germany).

LOH Analysis

For identification of LOH the following microsatellite markers flanking the *PFKFB3* locus on Chromosome 10, Position 6173242–6291107 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) were examined: *D10S189*, *D10S289*, *D10S1172*, and *D10S1713*. Nucleotide sequences were selected from Genome Databases (<http://www.gdb.org/> and <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 07/2009). *KLF6M4* marker sequence was taken from the study of Camacho-Vengas et al. (2007). Marker DNA segments were amplified in at least two independent PCRs with 2.5 U DFS-Taq DNA Polymerase (Bioron International, Ludwigshafen, Germany), 0.25 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, 0.4 μM of marker specific primers (*D10S189* A: CAAAAGTAACCATTTGAGCCC, B: TTGATAGAAGAAGCGATAGATCG; *D10S289* A: CTTACTCCTTGATT

TACCCAG, B: CTTCTGTGTACTCCTCCTC; *D10S1172* A: GGATACTACCAAGAGAGAG, B: ATCATCTATCTCTACTATCTG; *D10S1713* A: GACAGCAACTAACCTCCTGTAAG, B: TGTGTTATTCAAGGGTCAGC; *KLF6M4* A: GCATTAAGAATAGTGAAGGC, B: GATGTGTTTGGCTCAGGGA), and 200 ng DNA in a total volume of 100 μl. The PCR protocol was as follows: initial denaturation at 95°C for 5 min, 30 cycles at 95°C for 30 s, primer specific annealing temperature for 45 s, 72°C for 30 s, and a final extension at 72°C for 10 min. The PCR products were separated by electrophoresis in a 4% agarose gel (Biozyme LE Agarose, Biozyme Scientific GmbH, Hess Oldendorf, Germany). The gel was stained with ethidium bromide and a densitometric profile of DNA bands was obtained with Herolab E.A.S.Y. Plus Video Gel Documentation System (Herolab, Wiesloch, Germany), using Herolab E.A.S.Y. Win 32 Software (Version 4.1.225). According to Narla et al. (2001), loss of heterozygosity was assumed when the relative allelic ratio of intensities X_{LOH} of the respective tumor and blood samples was <0.7. Samples were marked as “noninformative”, when the blood sample showed no allelic separation.

Cloning and Sequencing of PCR Products

To verify the marker sequences, the PCR products were purified with Qiaquick Spin Gel Extraction Kit (Qiagen) and subcloned into the pGEM-T vector (Promega, Mannheim, Germany). The purified plasmid DNA (Plasmid Purification Kit, Qiagen) was sequenced with M13 universal primers, using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany). The sequencing reaction products were analyzed with the ABI Prism Genetic Analyzer model 377 (Applied Biosystems).

Quantitative RT-PCR Analysis

For quantification of *PFKFB3* and *UBI2K4* expression, 250 ng of total RNA were reverse-transcribed at least twice in a total volume of 5 μl with 1.25 U Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche Applied Science), 1 mM dNTPs and 1 μM of the respective reverse primers IR5 (AAGTCGCTGTCGCATTTGTC) and iPFK2re6 (GGAGCCTTTCATGTTAGAC) for *PFKFB3* and *UBI2K4*, respectively. Incubation was 30 min at 60°C. Quantitative real-time PCR

amplification was performed in the LightCycler (Roche Applied Science) in a total volume of 20 μ l with 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 250 μ g ml⁻¹ bovine serum albumin, 2% (w/v) sucrose, 4 mM MgCl₂, 0.125 μ M dNTPs, 1.25 U FirePol DNA Polymerase (Solis BioDyne, Tartu, Estonia), 0.5 μ M of the respective forward and reverse primers, SYBR Green I (Molecular Probes, Invitrogen) in a dilution of 1:40,000, and 2 μ l sample from the RT-reaction. The primer pairs were HBF5 (CAAAAGCTACCTGGCGAAAG), IR5 for *PFKFB3*, and 3PFK2fo2 (GAGACGCAATAGTGTCTAC), iPFK2re6 for *UBI2K4*. *GAPDH* was used as reference and quantified as above with the primers GAPDHfo (GATCATCAGCAATGCCTCCT) and GAPDHre (AGGTC CACCACTGACACGTT). Standard curves were generated for each run by serial five-fold dilution of the respective RNA standard, ranging for *PFKFB3* from 1×10^8 to 3.2×10^4 molecules μ l⁻¹, for *UBI2K4* from 1×10^7 to 3.2×10^3 molecules μ l⁻¹ and for *GAPDH* from 1×10^9 to 3.2×10^5 molecules μ l⁻¹. Standard RNAs for *PFKFB3* and *GAPDH* were synthesized as described in (Kessler et al., 2008), for *UBI2K4* as in (Zscharnack et al., 2009). PCR conditions were as follows: *PFKFB3*: initial denaturation at 95°C for 30 s, 40 cycles at 95°C for 0 s, 55°C for 3 s, 72°C for 8 s and 81°C for 5 s; *UBI2K4*: 95°C for 30 s, 40 cycles at 95°C for 5 s, 56°C for 8 s, 72°C for 10 s, and 88°C for 10 s; and *GAPDH*: 95°C for 30 s, 40 cycles at 95°C for 0 s, 60°C for 5 s, 72°C for 10 s. Product specificity was ensured by melting curve analysis with continuous fluorescence acquisition from 60 to 95°C.

Western Blot Analysis

Aliquots of protein extracts (75 mg of protein per lane) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in 8% (w/v) polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membrane (PALL Life Sciences, Dreieich, Germany). The blots were incubated overnight at 4°C with 1:500 diluted rabbit polyclonal antiserum targeting the N-terminal region of *PFKFB3* to cover all splice variants (Kessler et al., 2008). The lower part of the blot was developed with goat polyclonal antibodies against β -actin (1-19) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) in a dilution of 1:8000 serving as loading control. The blot was developed with horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG antibodies (Dianova, Hamburg, Germany) and anti-goat IgG antibodies

(Santa Cruz Biotechnology), respectively, followed by a chemiluminescence reaction with Super Signal West Pico Substrate (Pierce, Rockford, IL). Intensities of protein bands were analyzed with the Herolab E.A.S.Y Plus Video Gel Documentation System. The *PFKFB3* protein level was expressed as densitometric ratio of tumor and control protein. As control, the protein level from non-neoplastic brain tissue was used. The tumor/control intensity ratios were classified as follows: >0.5 (+); 0.5–1 (++); 1–1.5 (+++); and >1.5 (++++).

IDH1 Mutational Analysis

Genomic DNA from glioblastomas was analyzed for *IDH1* mutations at codon R132 as described (Balss et al., 2008). For mutational analysis of cDNA, 300 ng of tumor RNA were reverse-transcribed with AMV Reverse Transcriptase (Promega) according to manufacturer's instructions. Exon 4 of *IDH1* was amplified using primers IDH1f (CGGTCTTCAGAGAAGCCATT), IDH1rt2 (TATGTACCAGGTATGTCACC) and DFS-Taq DNA Polymerase. Sequencing of purified PCR products (PCR Purification Kit, Qiagen) was done as described above.

Statistical Analysis

The differences in RNA and protein levels referred to LOH on the respective markers were treated as nonparametric data and statistically tested with the Mann-Whitney-*U* test. To evaluate differences in *PFKFB3* protein, related to *PFKFB3* LOH, Fisher's exact test was used. Relationship between *PFKFB3* and *KLF6* LOH status was assessed using Pearson's correlation and Fisher's exact test. Correlation between *PFKFB3* and *UBI2K4* expression levels was analyzed with Spearman's *R* test. Survival curves were created according to the Kaplan–Meier method and evaluated with Mantel–Cox log rank test. All analyses were performed with the SPSS software (version 17.0, SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

Analysis of LOH at *PFKFB3* Gene Locus on 10p

To detect LOH at the *PFKFB3* gene locus on 10p15.1, LOH analysis was performed on 40 glioblastomas using four microsatellite markers. Criteria for the choice of the markers were a location as near as possible to the *PFKFB3* gene

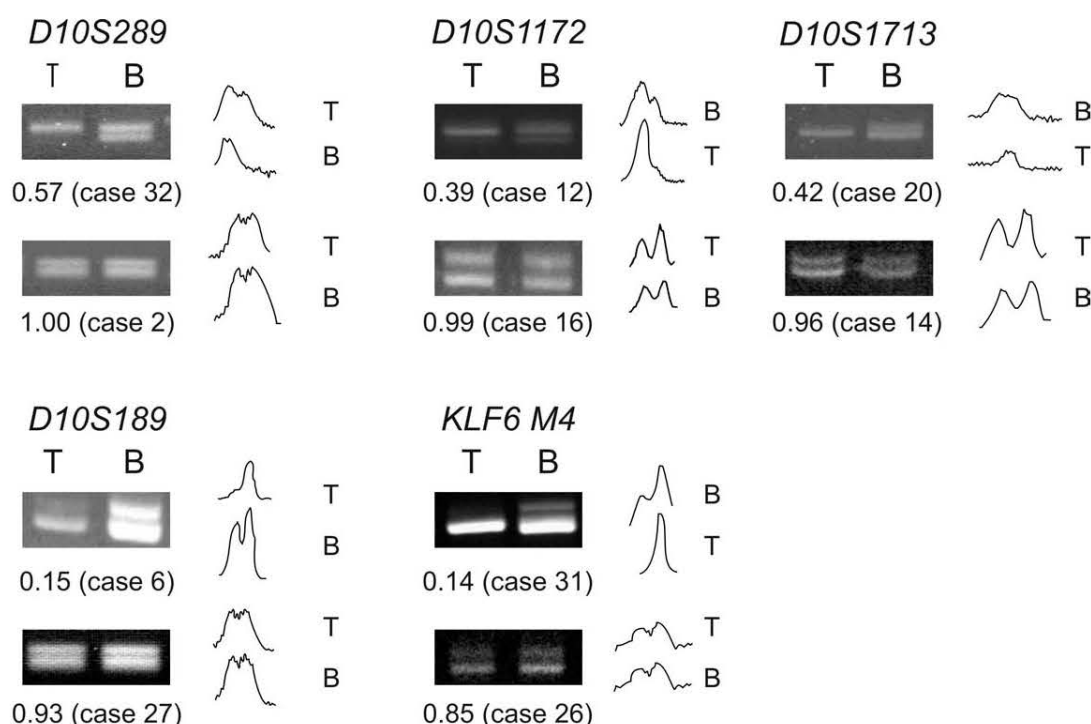


Figure 2. Representative results of microsatellite analysis in glioblastomas. PCR products of markers were resolved by electrophoresis on 4% agarose gel, marked by T (tumor DNA) and B (blood DNA). Densitometric profiles of PCR products are depicted beside the bands. Ratios of respective intensity values are shown below the pictures, indicating LOH if the allelic ratio X_{LOH} is less than 0.7.

and an allelic difference of at least one dinucleotide repeat to provide a visible separation of both alleles on agarose gel. The markers *D10S1713* and *D10S289* are located telomerically to the *PFKFB3* locus in a distance of 0.9 and 0.01 cM, respectively. The markers *D10S189* and *D10S1172* are located centromerically in a distance of 0.4 and 1.9 cM, respectively, to the target region (Fig. 1). All markers exhibited a clear separation of alleles in electrophoresis (Fig. 2) and were used for LOH analysis. *D10S289*, a marker recently published in Genome Database (NCBI database), was analyzed for the first time; the remaining markers were used in previous studies with gliomas (Voesten et al., 1997; Ichimura et al., 1998; Kon et al., 1998). The different markers were deleted with frequencies of 53.8–67.5% in glioblastomas (Table 1). Nearly 22.5% (9/40) of glioblastomas showed a complete LOH at all four markers. About 55% (22/40) of glioblastomas exhibited allelic loss of markers *D10S189* and *D10S289* directly flanking the *PFKFB3* gene and covering a distance of 0.5 cM (Table 1). These findings confirm the results of previous studies for chromosomal instability on 10p14-p15

in glioma and narrow it down to a section between *D10S189* and *D10S289*.

***PFKFB3* mRNA Level and LOH of *PFKFB3* Gene Locus in Glioblastomas**

As the gene locus of *PFKFB3* was lost in more than 50% of glioblastomas we examined whether the LOH of *PFKFB3* is reflected in *PFKFB3* mRNA level. The overall mRNA level of *PFKFB3* was determined by real-time RT-PCR using specific primers targeting a region existing in all *PFKFB3* splice variants and normalized to *GAPDH* mRNA level. Correlation between the LOH of the individual four markers described above and *PFKFB3* mRNA level revealed that *PFKFB3* expression was significantly decreased in glioblastomas with heterozygous deletion of the markers *D10S289* ($P < 0.001$) and *D10S189* ($P = 0.003$), respectively. No significant alterations of *PFKFB3* mRNA level were observed in glioblastomas with allelic loss of the markers *D10S1713* ($P = 0.825$) and *D10S1172* ($P = 0.590$) (Fig. 3). We assume that one allele of the *PFKFB3* gene is lost in tumors with LOH of the markers *D10S289*

TABLE 1. Summary of LOH and Western Blot Results in Glioblastomas

Patient no.	Age (years/gender)	Markers					<i>PFKFB3</i> protein level
		<i>D10S1713</i>	<i>D10S289</i>	<i>D10S189</i>	<i>D10S1172</i>	<i>KLF6 M4</i>	
15	39/F	●	●	●	●	●	++++
22	66/M	●	●	●	●	●	+
6	49/F	●	●	●	●	●	+
11	39/M	●	●	●	●	●	++++
20	61/M	●	●	●	●	●	+
21	70/F	●	●	●	●	●	+
35	62/F	●	●	●	●	●	ni
30	61/M	●	●	●	●	○	+++
25	72/F	●	●	●	●	○	++
29	62/F	●	●	●	●	○	+
28	47/M	●	●	●	●	●	+++
7	49/F	●	●	●	●	●	+
17	66/M	●	●	●	○	○	++++
26	53/F	●	●	●	○	○	++
13	44/F	○	●	●	●	●	+++
40	52/F	○	●	●	●	ni	+
37	81/F	○	●	●	●	○	+
31	41/F	○	●	●	○	●	+
38	62/F	○	●	●	○	●	+
34	37/M	○	●	●	○	○	ni
36	57/F	○	●	●	○	○	ni
32	73/F	ni	●	●	●	ni	ni
5	22/M	●	○	●	●	○	+
2	72/F	●	○	●	●	●	+++
10	61/M	●	○	●	○	○	+++
16	72/F	●	○	●	○	●	+++
9	66/F	○	●	○	○	●	++++
12	51/F	○	●	○	●	●	+++
18	65/F	●	○	○	●	●	++++
23	67/M	●	○	○	●	ni	+++
3	66/M	●	○	○	○	○	++++
33	63/F	●	○	○	●	ni	ni
8	35/F	○	○	○	●	●	+++
24	28/M	○	○	○	●	●	+++
1	34/F	○	○	○	○	●	+++
4	52/F	○	○	○	○	●	+++
19	68/M	○	○	○	●	○	+++
27	76/M	○	○	○	●	○	++++
14	64/M	○	○	○	○	○	+++
39	81/F	○	○	○	○	○	++++
LOH %		53.8	60.0	67.5	65.0	58.3	

●, positive LOH; ○, negative LOH; ni, not informative; *PFKFB3* protein level was expressed as densitometric ratio of tumor and control protein: >0.5 (+); 0.5–1 (++); 1–1.5 (+++), and >1.5.

and *D10S189* spanning a small region of 0.5 cM around the *PFKFB3* gene. Taking into account these results, glioblastomas were grouped into the cluster *PFKFB3* LOH (+) comprising all samples with LOH in both, *PFKFB3* flanking markers *D10S289* and *D10S189*, and the cluster *PFKFB3* LOH (–) containing all samples without LOH in these two markers. Samples with LOH only in one of the two markers were excluded (Table 2). A decrease of mean *PFKFB3* mRNA level by a factor of two ($P < 0.001$) could be detected in glioblastomas of cluster *PFKFB3* LOH (+) com-

pared with cluster *PFKFB3* LOH (–) (Fig. 4). This representative difference in mRNA level indicates a loss of one allele of *PFKFB3* gene. We conclude that the *PFKFB3* gene in 10p14-p15 is a target region for LOH in glioblastomas.

Allelic Loss of *PFKFB3* Affects *PFKFB3* Protein Level

To determine whether the loss of one allele of *PFKFB3* has an effect on *PFKFB3* protein expression, Western blot analysis was performed.

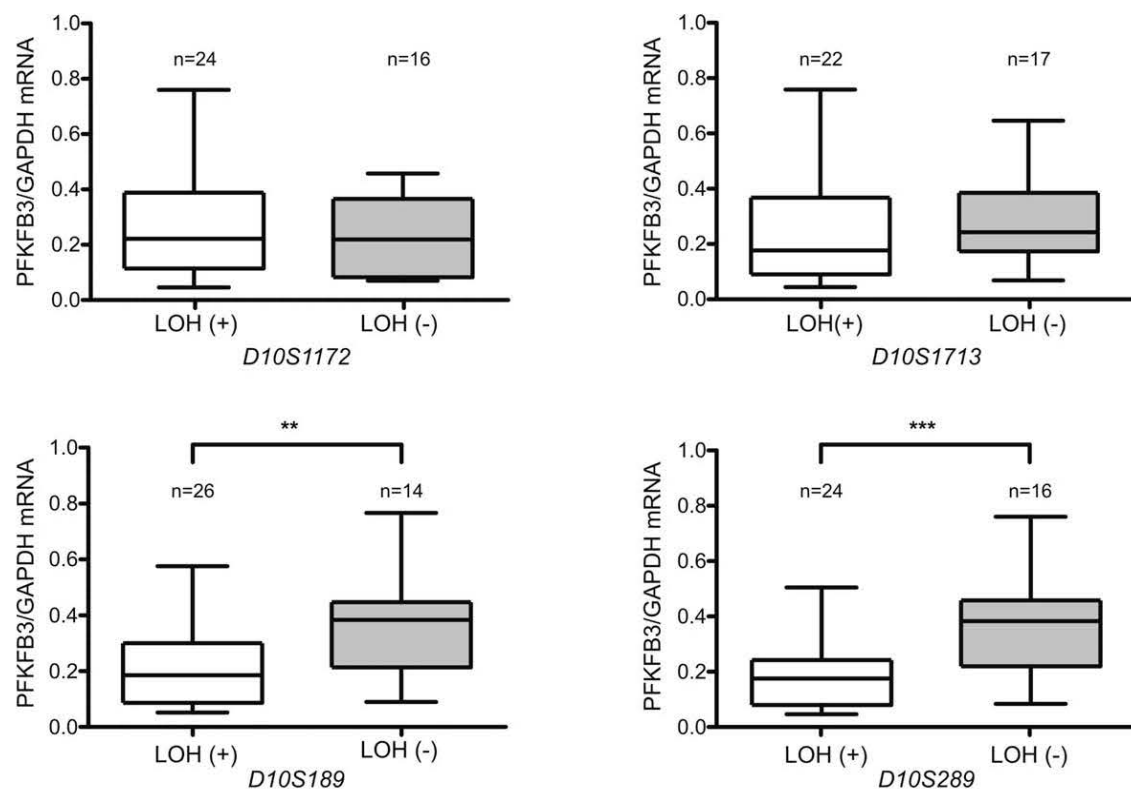


Figure 3. LOH of *PFKFB3* flanking markers in glioblastomas correlated with *PFKFB3*/*GAPDH* mRNA ratios. LOH (+) and LOH (-) indicate loss and no loss of heterozygosity of the respective marker. Mann-Whitney-U test was used for statistical analysis, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

TABLE 2. Classification of Cluster *PFKFB3* LOH (+) and LOH (-)

	Markers	
	<i>D10S189</i>	<i>D10S289</i>
Cluster <i>PFKFB3</i> LOH (+)	●	●
Cluster <i>PFKFB3</i> LOH (-)	○	○
Not classified	○	●

●, positive LOH; ○, negative LOH. Cluster *PFKFB3* LOH (+) contains all cases with positive LOH in both markers *D10S189* and *D10S289*, cluster *PFKFB3* LOH (-) all with negative LOH and not classified are these cases in which either one of the markers is negative.

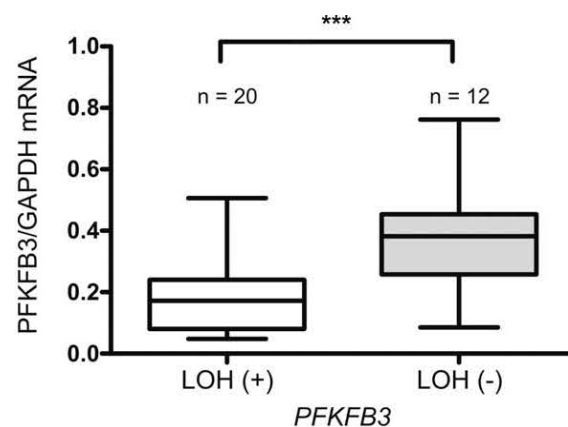


Figure 4. Correlation of *PFKFB3* mRNA level with LOH of the *PFKFB3* gene locus in glioblastomas. Cluster *PFKFB3* LOH (+) comprises tumors with loss of heterozygosity in *PFKFB3* flanking markers *D10S189* and *D10S289*, cluster *PFKFB3* LOH (-) comprises tumors without loss of heterozygosity in these markers (see Table 2). Mann-Whitney-U test was used for statistical analysis, *** $P < 0.001$.

We could detect different *PFKFB3* protein expression in glioblastomas, ranging from very low (+) to very high (+++++) expression level (Fig. 5). Based on this, two groups of glioblastomas were classified, group I (+/++) and group II (++++/+++++), and correlated to cluster classification *PFKFB3* LOH (+) and LOH (-) (Table 3). All glioblastomas with low *PFKFB3* protein level (12/12, group I) were allocated to cluster *PFKFB3* LOH (+). The majority of glioblasto-

mas with higher *PFKFB3* protein level (11/17, group II) was found at *PFKFB3* LOH (-). The difference in *PFKFB3* protein level between clusters *PFKFB3* LOH (+) and LOH (-) was

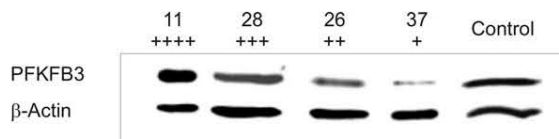


Figure 5. *PFKFB3* protein expression in glioblastomas. Results of Western blot analysis of four representative glioblastomas and one non-neoplastic brain tissue as a control are shown. The intensities of protein signals were quantitated by densitometric scanning and related to intensity of control. Tumor/control intensity ratio <0.5 (+), $=0.5-1$ (++), $=1-1.5$ (+++), >1.5 (++++). Numbers refer to patients.

TABLE 3. Relation Between *PFKFB3* Protein Level and LOH of the *PFKFB3* Gene Locus in Glioblastomas

	<i>PFKFB3</i> protein level	
	(+/++)	(++++/+++++)
Cluster <i>PFKFB3</i> LOH (+)	12	6
Cluster <i>PFKFB3</i> LOH (-)	0	11
$r_D = 0.657, P < 0.001$		

The *PFKFB3* protein level was expressed as densitometric ratio of tumor and non-neoplastic control protein. Tumor/control ratio >0.5 (+); $0.5-1$ (++); $1-1.5$ (+++), and >1.5 (++++). P-value was calculated using Fisher-Exact Test and correlation was computed with Pearson's phi-coefficient. Cluster definition is described in Table 2.

significant ($P < 0.001$). This indicates that deletion of one allele of the *PFKFB3* gene in glioblastomas leads to a lower protein level of *PFKFB3*.

Expression of Splice Variant 4 (*UBI2K4*) is Decreased in Glioblastomas with *PFKFB3* LOH

To elicit a possible reason for the loss of one allele of the *PFKFB3* gene we focused on expression of the *PFKFB3* splice variant 4 (*UBI2K4*). As shown by Zscharnack et al. (2009), *UBI2K4* suppresses anchorage-independent growth of U87 glioblastoma cells and appears to act as tumor suppressor. To find out whether *UBI2K4* is altered in those glioblastomas with allelic loss of *PFKFB3*, we analyzed the *UBI2K4* mRNA level. Correlation of mRNA data to LOH clusters (Fig. 6) revealed a significant decrease of *UBI2K4* mRNA level in glioblastomas of cluster *PFKFB3* LOH (+) by a factor of two ($P < 0.001$) compared with cluster *PFKFB3* LOH (-). Furthermore, the *UBI2K4* mRNA level correlates with *PFKFB3* mRNA level ($r = 0.725$, $P = 0.001$), i.e., *UBI2K4* expression is decreased concordantly with overall *PFKFB3* expression (Fig. 7). This confirms that a loss of one *PFKFB3* allele effectively reduces the expression of the growth-inhibiting splice variant *UBI2K4*. Hence, LOH

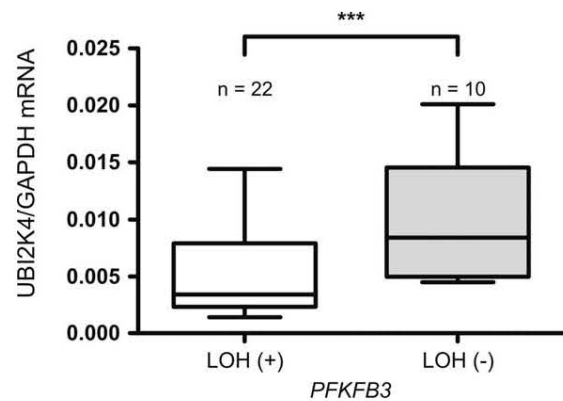


Figure 6. Expression of splice variant 4 (*UBI2K4*) is correlated with LOH of the *PFKFB3* gene locus in glioblastomas. *PFKFB3* LOH (+) indicates glioblastomas with LOH of *PFKFB3* flanking markers *D10S189* and *D10S289*, *PFKFB3* LOH (-) indicates tumors without LOH of these markers. Mann-Whitney-U test was used for statistical analysis, *** $P < 0.001$.

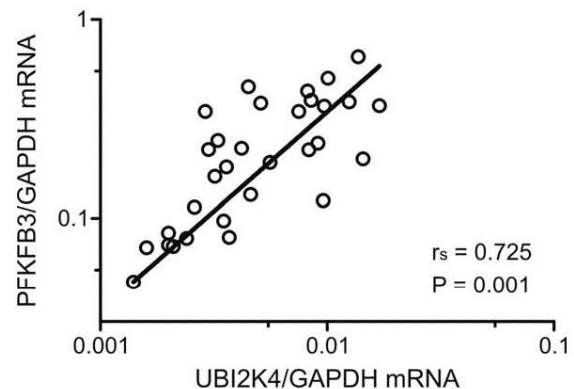


Figure 7. Correlation between mRNA levels of total *PFKFB3* and splice variant 4 (*UBI2K4*) in glioblastomas. *PFKFB3*/GAPDH mRNA ratios were plotted against *UBI2K4*/GAPDH mRNA ratios. Statistical significance was assessed by Spearman's R test.

(+) of *PFKFB3* may be a growth advantage for glioblastomas.

LOH of the *KLF6* Gene Locus in Glioblastomas

Recently, the gene locus of *KLF6*, a putative tumor suppressor gene, was discussed as possible target of LOH on 10p (Montanini et al., 2004). The *KLF6* gene is located telomerically to the *PFKFB3* locus in a distance of about 2.5 cM (Fig. 1). To determine the *KLF6* LOH the specific microsatellite marker *KLF6M4*, proximately flanking the *KLF6* gene and showing the highest LOH incidence in a previous analysis, was used (Camacho-Vanegas et al., 2007). In our study, the *KLF6M4* marker was lost with a frequency of 60% (21/35). In 12/30 (40%) glioblastomas *KLF6*

LOH (+) and *PFKFB3* LOH (+) occur concomitantly. The 12/30 glioblastomas showed either *KLF6* LOH (+) or *PFKFB3* LOH (+). We found no significant correlation between *KLF6* and *PFKFB3* LOH ($r_s = 0.172$; $P = 0.454$). Furthermore, neither *PFKFB3* mRNA nor protein levels were significantly reduced in glioblastomas with *KLF6* LOH (+) compared with *KLF6* LOH (-). Hence, deletion of the *KLF6* gene locus, represented by marker *KLF6M4*, may occur either concordantly with *PFKFB3* LOH (+) or as independent alteration on chromosomal region 10p15.

LOH of *PFKFB3* and *UBI2K4* Expression Level are Associated with Overall Survival in Glioblastoma Patients

As shown above, the *UBI2K4* expression level correlates significantly with LOH of *PFKFB3*. To assess the prognostic value of *UBI2K4* reduction as a consequence of deletion of one *PFKFB3* allele, *PFKFB3* LOH and *UBI2K4* expression level were correlated with survival of glioblastoma patients. Secondary glioblastomas or glioblastomas carrying *IDH1* mutations are known to be associated with an improved survival of patients (Ohgaki et al., 2004; Parsons et al., 2008). In two of the analyzed glioblastomas, the R132H mutation in *IDH1* was detected. These two patients as well as two patients with diagnosed secondary glioblastoma were excluded from the survival analysis. An association between *PFKFB3* LOH and survival was observed in the group of patients with primary glioblastomas. Patients with *PFKFB3* LOH (mean age of 53.1 years) showed a significant shorter survival than patients without *PFKFB3* LOH [mean age of 58 years; Fig. 8(a)]. We also classified patients according to *UBI2K4* expression level in glioblastomas. The median *UBI2K4*/*GAPDH* ratio determined in the entire cohort of glioblastomas was defined as critical limit (0.0057). In the group of patients with higher *UBI2K4* expression level (mean age of 58.4 years) the survival was significantly longer than in the group of patients with lower *UBI2K4* level [mean age of 60.8 years; Fig. 8(b)]. It should be noted that in Figure 8(b), six glioblastoma patients were included which were described previously (Zscharnack et al., 2009). The obtained results indicate that LOH of *PFKFB3* and *UBI2K4* expression level may be of predictive value for survival in glioblastoma patients.

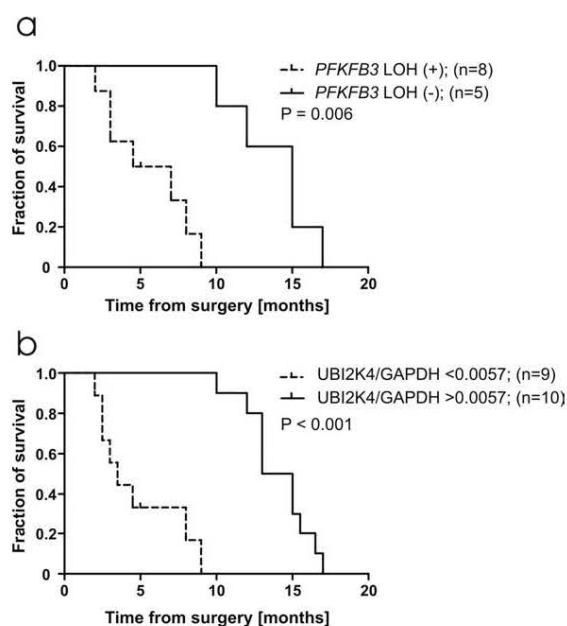


Figure 8. Survival of patients with glioblastomas in relation to LOH of *PFKFB3* and *UBI2K4* expression status. Secondary glioblastomas and glioblastomas carrying *IDH1* mutations were excluded from analysis. (a) Survival of patients with or without *PFKFB3* LOH. (b) Survival of patients with low and high *UBI2K4* expression. The median *UBI2K4*/*GAPDH* mRNA ratio in all analyzed glioblastomas was 0.0057. Statistical significance was assessed by Mantel-Cox log-rank test.

DISCUSSION

In this study, LOH of the *PFKFB3* gene was observed in 55% (22/40) of glioblastomas. Deletions of this chromosomal region were shown in previous reports, but the lost tumor suppressor gene could not to be identified (Voesten et al., 1997; Ichimura et al., 1998; Tada et al., 2001). Here, we demonstrate that *PFKFB3* is a target gene for LOH on 10p14-p15 in glioblastomas. Furthermore, zinc finger transcription factor *KLF6* is discussed as candidate tumor suppressor gene on 10p14-p15. In agreement with the results of Camacho-Vanegas et al. (2007), we found allelic deletion of the *KLF6* gene in glioblastomas. However, the frequency of *KLF6* LOH in 60% (21/35) of cases was lower than the one (97.8%) observed by Camacho-Vanegas et al. (2007). As the LOH of *KLF6* gene, located about 2.5 cM telomeric to *PFKFB3*, is not stringently correlated to the event of *PFKFB3* LOH the deletion seems to be limited to a restricted small area on short arm of chromosome 10. Apparently, the occurrence of LOH on *PFKFB3* and *KLF6*, respectively, are highly specific genetic alterations in glioblastomas. Our results demonstrate that *KLF6* is not the main target of LOH on

10p14-p15, supporting the assumption by Montanini et al. (2004).

As expected, the allelic loss of *PFKFB3* results in a decrease of *PFKFB3* mRNA level to about 50%. We also detected a reduced protein level of *PFKFB3* in glioblastomas with LOH. *PFKFB3* is normally found to be upregulated in transformed cells and tumors induced by mitogenic and hypoxic stimuli maintaining the high glycolytic flux (Minchenko et al., 2005). Kessler et al. (2008) reported that *PFKFB3* protein expression is upregulated also in glioblastomas when compared with low-grade astrocytomas and non-neoplastic brain tissue. However, a large variation of *PFKFB3* level was observed in glioblastomas. As shown previously, the *PFKFB3* protein level in glioblastomas overexpressing *EGFR* is about half of that in glioblastomas without *EGFR* overexpression (Kessler et al., 2008). *EGFR* amplification typically copresents with LOH on 10p, particularly occurring in primary glioblastomas (Fujisawa et al., 2000; Riemenschneider, 2009). Evidently, the lowered *PFKFB3* protein level in glioblastomas with *EGFR* amplification is the result of LOH on *PFKFB3* in 10p14-p15 shown by us.

A reduction of total *PFKFB3* level by allelic deletion should be unfavorable to the tumor. It might lead to a decreased concentration of cytosolic fructose-2,6-bisphosphate which, in turn, should reduce the high rate of glycolysis which is a hallmark of glioblastomas (Di Chiro et al., 1982; Howe et al., 2003). In HeLa cells, *PFKFB3* was shown to translocate into the cell nucleus and to favor cell proliferation by activating cyclin dependent protein kinases via fructose-2,6-bisphosphate (Yalcin et al., 2009b). In the same cell type, silencing of *PFKFB3* by siRNA was found to decrease glycolysis, induce cell-cycle delay, and to inhibit anchorage-independent growth (Calvo et al., 2006).

PFKFB3 mRNA is known to undergo alternative splicing (Kessler and Eschrich, 2001). Gliomas differ in their *PFKFB3* splice pattern, depending on their malignancy. Low grade astrocytomas express four splice variants, *UBI2K3-6*, whereas glioblastomas massively express splice variants *UBI2K5* and *UBI2K6* and only a small percentage of *UBI2K4* (Zscharnack et al., 2009). Remarkably, the splice variant *UBI2K4* reduces the colony forming ability of U87 glioblastoma cells and its expression decreases during progression from low- to high-grade astrocytomas (Zscharnack et al., 2009). In this study, we found

that *UBI2K4* mRNA level is reduced by a factor of two in glioblastomas with LOH on *PFKFB3* compared with glioblastomas without LOH. Presumably, the decline of the growth inhibiting splice variant *UBI2K4* over-compensates for the total decrease of *PFKFB3*.

The fact that LOH of *PFKFB3* reduces the growth-inhibiting splice variant *UBI2K4* prompted us to analyze the correlation between *PFKFB3* LOH, *UBI2K4* expression level, and overall survival of glioblastoma patients. We have shown that both the *PFKFB3* LOH on 10p14-p15 and the resulting low *UBI2K4* mRNA level in glioblastomas are associated with a poor prognosis. It is generally accepted that LOH on 10q is an unfavorable prognostic factor (Schmidt et al., 2002; Ohgaki et al., 2004; Homma et al., 2006). The association of survival with LOH on 10p was less pronounced. Wager et al. (2008) demonstrated a correlation between 10p LOH and shorter survival in the overall cohort of gliomas but not in the fraction of glioblastomas (Wager et al., 2008). In the study of Schmidt et al. (2002), a poor prognosis of patients with LOH on 10p12 ($P = 0.0287$) was reported. Interestingly, LOH of the *KLF6* locus in 10p14-p15 was not correlated with overall survival as shown by Wager et al. (2008).

We conclude that LOH on 10p14-p15 in glioblastomas targets the *PFKFB3* gene and in particular the splice variant *UBI2K4*. The *PFKFB3* LOH seems to promote the malignancy of glioblastomas by lowering *UBI2K4* levels, leading to a significant decrease in survival of affected glioblastoma patients.

REFERENCES

- Atsumi T, Chesney J, Metz C, Leng L, Donnelly S, Makita Z, Mitchell R, Bucala R. 2002. High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (*PFKFB3*) in human cancers. *Cancer Res* 62:5881–5887.
- Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. 2008. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol* 116:597–602.
- Calvo MN, Bartrons R, Castaño E, Perales JC, Navarro-Sabaté A, Manzano A. 2006. *PFKFB3* gene silencing decreases glycolysis, induces cell-cycle delay and inhibits anchorage-independent growth in HeLa cells. *FEBS Lett* 580:3308–3314.
- Camacho-Vanegas O, Narla G, Teixeira MS, DiFeo A, Misra A, Singh G, Chan AM, Friedman SL, Feuerstein BG, Martignetti JA. 2007. Functional inactivation of the *KLF6* tumor suppressor gene by loss of heterozygosity and increased alternative splicing in glioblastoma. *J Int Cancer* 121:1390–1395.
- Chesney J, Mitchell R, Benigni F, Bacher M, Spiegel L, Al-Abed Y, Han JH, Metz C, Bucala R. 1999. An inducible gene product for 6-phosphofructo-2-kinase with an AU-rich instability element: Role in tumor cell glycolysis and the Warburg effect. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3047–3052.
- Di Chiro G, DeLaPaz RL, Brooks RA, Sokoloff L, Kornblith PL, Smith BH, Patronas NJ, Kuffa CV, Kessler RM, Johnston GS,

- Manning RG, Wolf AP. 1982. Glucose utilization of cerebral gliomas measured by [18F] fluorodeoxyglucose and positron emission tomography. *Neurology* 32:1323-1329.
- Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, Colella S, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. 2000. Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest* 80:65-72.
- Hata N, Yoshimoto K, Yokoyama N, Mizoguchi M, Shono T, Guan Y, Tahira T, Kukita Y, Higasa K, Nagata S, Iwaki T, Sasaki T, Hayashi K. 2006. Allelic losses of chromosome 10 in glioma tissues detected by quantitative single-strand conformation polymorphism analysis. *Clin Chem* 52:370-378.
- Homma T, Fukushima T, Vaccarella S, Yonekawa Y, Di Patre PL, Franceschi S, Ohgaki H. 2006. Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:846-854.
- Howe FA, Barton SJ, Cudlip SA, Stubbs M, Saunders DE, Murphy M, Wilkins P, Opstad KS, Doyle VL, McLean MA, Bell BA, Griffiths JR. 2003. Metabolic profiles of human brain tumors using quantitative in vivo 1H magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med* 49:223-232.
- Ichimura K, Schmidt EE, Miyakawa A, Goike HM, Collins VP. 1998. Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. *Genes Chromosomes Cancer* 22:9-15.
- Jeng Y-M, Hsu H-C. 2003. KLF6, a putative tumor suppressor gene, is mutated in astrocytic gliomas. *Int J Cancer* 105:625-629.
- Kessler R, Eschrich K. 2001. Splice isoforms of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 87:190-195.
- Kessler R, Bleichert F, Warnke J-P, Eschrich K. 2008. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB3) is up-regulated in high-grade astrocytomas. *J Neurooncol* 86:257-264.
- Kimmelman AC, Ross DA, Liang BC. 1996. Loss of heterozygosity of chromosome 10p in human gliomas. *Genomics* 34:250-254.
- Kon H, Sonoda Y, Kumabe T, Yoshimoto T, Sekiya T, Murakami Y. 1998. Structural and functional evidence for the presence of tumor suppressor genes on the short arm of chromosome 10 in human gliomas. *Oncogene* 16:257-263.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114:97-109.
- Mahlknecht U, Chesney J, Hoelzer D, Bucala R. 2003. Cloning and chromosomal characterization of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 gene (PFKFB3, iPFK2). *Int J Oncol* 23:883-891.
- Manzano A, Rosa JL, Ventura F, Pérez JX, Nadal M, Estivill X, Ambrosio S, Gil J, Bartrons R. 1998. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of a ubiquitously expressed human 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene (PFKFB3). *Cytogenet Cell Genet* 83:214-217.
- Minchenko OH, Opentanova I, Caro J. 2003. Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression in vivo. *FEBS Lett* 554:264-270.
- Minchenko OH, Ogura T, Opentanova IL, Minchenko DO, Esumi H. 2005. Splice isoform of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4: Expression and hypoxic regulation. *Mol Cell Biochem* 280:227-234.
- Montanini L, Bissola L, Finocchiaro G. 2004. KLF6 is not the major target of chromosome 10p losses in glioblastomas. *Int J Cancer* 111:640-641.
- Narla G, Heath KE, Reeves HL, Li D, Giono LE, Kimmelman AC, Glucksman MJ, Narla J, Eng FJ, Chan AM, Ferrari AC, Martignetti JA, Friedman SL. 2001. KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science* 294:2563-2566.
- Ohgaki H, Kleihues P. 2005. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 109:93-108.
- Ohgaki H, Kleihues P. 2007. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170:1445-1453.
- Ohgaki H, Kleihues P. 2009. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci* 100:2235-2241.
- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schuler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lütolf UM, Kleihues P. 2004. Genetic pathways to glioblastoma: A population-based study. *Cancer Res* 64:6892-6899.
- Okar DA, Manzano A, Navarro-Sabate A, Riera L, Bartrons R, Lange AJ. 2001. PFK-2/FBPase-2: Maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends Biochem Sci* 26:30-35.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA, Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321:1807-1812.
- Rasheed BK, McLendon RE, Friedman HS, Friedman AH, Fuchs HE, Bigner DD, Bigner SH. 1995. Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: A common deletion region in 10q25. *Oncogene* 10:2243-2246.
- Rider MH, Bertrand L, Vertommen D, Michels PA, Rousseau GG, Hue L. 2004. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: Head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochem J* 381:561-579.
- Riemenschneider MJ. 2009. Molecular neuropathology of gliomas. *Int J Mol Sci* 10:184-212.
- Riemenschneider MJ, Reifenberger G. 2009. Novel insights into the pathogenesis of gliomas based on large-scale molecular profiling approaches. *Curr Opin Neurol* 22:619-624.
- Schmidt MC, Antweiler S, Urban N, Mueller W, Kuklik A, Meyer-Puttlitz B, Wiestler OD, Louis DN, Fimmers R, von Deimling A. 2002. Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:321-328.
- Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Nakamura H, Hirano H, Kuratsu J, Kochi M, Saya H, Ushio Y. 2001. Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 10 in patients with malignant astrocytic tumors: Correlation with patient age and survival. *J Neurosurg* 95:651-659.
- Van Schaftingen E, Jett MF, Hue L, Hers HG. 1981. Control of liver 6-phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate and other effectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:3483-3486.
- Voesten AM, Bijleveld EH, Westerveld A, Hulsebos TJ. 1997. Fine mapping of a region of common deletion on chromosome arm 10p in human glioma. *Genes Chromosomes Cancer* 20:167-172.
- Wager M, Menei P, Guilhot J, Levillain P, Michalak S, Bataille B, Blanc JL, Lapiere F, Rigoard P, Milin S, Duthe F, Bonneau D, Larsen CJ, Karayan-Tapon L. 2008. Prognostic molecular markers with no impact on decision-making: The paradox of gliomas based on a prospective study. *Br J Cancer* 98:1830-1838.
- Warburg O. 1956. On the origin of cancer cells. *Science* 123:309-314.
- Watanabe F, Furuya E. 1999. Tissue-specific alternative splicing of rat brain fructose 6-phosphate 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. *FEBS Lett* 458:304-308.
- Yalcin A, Telang S, Clem B, Chesney J. 2009a. Regulation of glucose metabolism by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases in cancer. *Exp Mol Pathol* 86:174-179.
- Yalcin A, Clem BF, Simmons A, Lane A, Nelson K, Clem AL, Brock E, Siow D, Wattenberg B, Telang S, Chesney J. 2009b. Nuclear targeting of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) increases proliferation via cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem* 284:24223-24232.
- Zscharnack K, Kessler R, Bleichert F, Warnke JP, Eschrich K. 2009. The PFKFB3 splice variant UB12K4 is downregulated in high-grade astrocytomas and impedes the growth of U87 glioblastoma cells. *Neuropathol Appl Neurobiol* 35:566-578.

6 Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Der PFKFB3 Genlocus als Zielstruktur des LOH 10p in Glioblastomen

eingereicht von: Michael Fleischer

08.01.1982 in Stuttgart

Angefertigt im: Institut für Biochemie

Universität Leipzig, Medizinische Fakultät

Direktor Prof. Dr. med. Torsten Schöneberg

Betreuer: Prof. Dr. Klaus Eschrich

Dr. Renate Kessler

Ein LOH des Chromosoms 10p wird in etwas mehr als 50 % aller Glioblastome beobachtet und betrifft vor allem die Region 10p14-p15. Das Gen des glykolytischen Regulatorenszyms PFKFB3 ist auf 10p15.1 lokalisiert. Aufgrund der Tatsache, dass die Spleißvariante UBI2K4

des PFKFB3-Gens Tumorsuppressoreigenschaften hat, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob der PFKFB3-Genlocus Zielstruktur des LOH 10p ist.

Für die LOH Analyse von 10p14-p15 wurden 40 Glioblastome auf die Präsenz der Mikrosatellitenmarker D10S1713, D10S1172, D10S189 und D10S289 getestet. Zwei der Marker (D10S1713, D10S289) lagen telomerisch und zwei (D10S189, D10S1172) zentromerisch zum PFKFB3-Genort. Es wurde ein Bereich von 2,9 cM in unmittelbarer Nähe des PFKFB3-Gens abgedeckt. Die Marker D10S189 und D10S289 flankieren das PFKFB3-Gen direkt in einem Abstand von 0,4 bzw. 0,01 cM. Bei den verwendeten Markern waren Unterschiede innerhalb der repetitiven Sequenzen von 2 oder mehr Basenpaaren vorhanden, sodass die Separation der Allele in der Gelelektrophorese gut sichtbar war. Für die einzelnen Marker zeigte sich ein alleler Verlust in 53,8 - 67,5 % der untersuchten Glioblastome. Dieses Ergebnis deckt sich weitestgehend mit den Angaben in der Literatur zur Häufigkeit des LOH in dieser Region. Der Marker D10S189 weist mit 67,5 % den höchsten Allelverlust auf. Um die Frage zu klären, ob der LOH den PFKFB3-Genlocus betrifft, wurde geprüft, ob die mRNA-Konzentration der PFKFB3 mit dem LOH der einzelnen Marker korreliert. Für die beiden am weitesten entfernten Marker (D10S1713, D10S1172) hatte der LOH keinen signifikanten Einfluss auf den PFKFB3-mRNA-Spiegel, wohingegen der LOH der direkt flankierenden Marker (D10S189, D10S289) eine signifikante Abnahme der PFKFB3-mRNA-Konzentration zur Folge hatte. Unter der Annahme, dass mit dem Verlust der beiden Marker D10S189 und D10S289, die einen Bereich von 0,5cM überspannen, der PFKFB3-Genlocus deletiert wird, wurden die Glioblastome in die Gruppe mit Allelverlust (LOH (+)) und die Gruppe ohne Allelverlust (LOH (-)) der PFKFB3 eingeteilt. Bei 55 % der Glioblastome zeigte sich ein PFKFB3-LOH (+), der mit einer Erniedrigung der PFKFB3-mRNA-Konzentration um etwa den Faktor 2 ($p < 0,001$) im Vergleich zur Gruppe der PFKFB3 LOH (-) Glioblastome verbunden war.

Der Gehalt an PFKFB3-Protein in den Glioblastomproben wurde mit Hilfe der Western-Blot Analyse analysiert. Die Glioblastome wurden anhand der Intensität der Proteinbanden in die Gruppen mit niedriger (+/ ++) und hoher (+++/ ++++) PFKFB3-Proteinkonzentration klassifiziert. Es ergab sich eine positive Korrelation zwischen niedriger PFKFB3-Konzentration in der LOH (+) Gruppe und einer hohen Konzentration in der LOH (-) Gruppe ($R=0,657$, $p < 0,001$). Der Verlust des PFKFB3-Genlocus in Glioblastomen hat daher eine verringerte Bildung des PFKFB3-Proteins zur Folge.

Für das PFKFB3-Gen sind 6 verschiedene Spleißvarianten UBI2K1-6 bekannt. Die Spleißvariante UBI2K4 hat Tumorsuppressoreigenschaften, in dem sie das Wachstum von U87-Glioblastomzellen in Softagarkulturen hemmt. Für den Nachweis, dass die UBI2K4 von der Deletion in 10p14-p15 betroffen ist, wurde der mRNA-Spiegel dieser Spleißvariante bestimmt. In Glioblastomen mit PFKFB3-LOH (+) findet sich eine deutlich niedrigere mRNA-Konzentration dieser Spleißvariante als in Glioblastomen ohne Verlust des Genlocus ($p < 0,001$). Die UBI2K4-mRNA Konzentration korreliert zudem positiv mit dem totalen PFKFB3 mRNA-Spiegel. Daraus kann geschlossen werden, dass die Spleißvariante UBI2K4 ein Zielprotein des allelen Verlusts in 10p14-p15 ist.

Der Krüppel-like Transkriptionsfaktor 6 (KLF6) wird in der Literatur als mögliches Tumorsuppressorgen in der Region 10p14-p15 diskutiert. Ein LOH des KLF6-Genlocus, der 2,5 cM telomerisch zur PFKFB3 lokalisiert ist, wurde in Glioblastomen bereits nachgewiesen. Für die Detektion des KLF6-LOH wurde ein in unmittelbarer Nähe des KLF6-Locus liegender Mikrosatellitenmarker verwendet, der in der Literatur als am häufigsten deletiert beschrieben wird. Die Deletion von KLF6 wurde in der vorliegenden Arbeit in 60 % der untersuchten Glioblastome beobachtet und ist damit geringer als in der Literatur angegeben (92,8 %, (Camacho-Vanegas et al., 2007)). Eine Korrelation des KLF6-LOH mit dem LOH des PFKFB3-Genlocus in 10p14-p15 wurde nicht gefunden ($R = 0,172$, $p = 0,454$). Zudem konnte keine Verminderung des mRNA oder Proteinspiegels der PFKFB3 in den KLF6-LOH (+) Glioblastomen festgestellt werden. Der KLF6-LOH tritt offensichtlich als eigenständige genetische Veränderung, unabhängig vom PFKFB3-LOH, auf. Die allelen Verluste der KLF6- bzw. PFKFB3-Gene sind spezifische genetische Ereignisse, die unabhängig voneinander einen Wachstumsvorteil für Glioblastome darstellen.

Da genetische Veränderungen in Glioblastomen die Progression zu aggressiveren Formen fördern, wurde geprüft, wie sich der PFKFB3-LOH und in dessen Folge die Erniedrigung der UBI2K4-Bildung auf die Überlebenszeit der Patienten auswirken. Um den Effekt des LOH isoliert darstellen zu können, wurden in der Analyse sekundäre Glioblastome sowie Glioblastome mit IDH1-Mutationen ausgeschlossen, da für diese Tumore per se eine höhere Überlebenszeit der Patienten nachgewiesen ist (Hartman et al., 2010). Die Gruppe der Patienten mit PFKFB3-LOH (+) hatte eine deutlich schlechtere Prognose (mittlere Überlebenszeit 7,5 Monate) als die PFKFB3-LOH (-) Gruppe (mittlere Überlebenszeit 15,8 Monate, $p = 0,006$). Die Klassifizierung der Patienten nach der UBI2K4-mRNA Konzentration

ergab, dass Patienten mit hoher UBI2K4-Expression (Median von 0,0057 UBI2K4/GAPDH als kritischer Wert) signifikant länger überlebten als Patienten mit niedriger UBI2K4-Expression ($p < 0.001$).

Neben den Befunden, dass chromosomale Fragmente der Region 10p14-p15 einen negativen Effekt auf das Wachstum der Glioblastomzelllinie T98G haben (Kon et al., 1998) und dass die Spleißvariante UBI2K4 des *PFKFB3*-Gens das dreidimensionale Wachstum der Glioblastomzelllinie U87 hemmt (Zscharnack et al., 2009), bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass es sich bei der UBI2K4 um ein Protein mit Tumorsuppressoreigenschaften handelt. Der partielle Verlust dieser Spleißvariante ist offenbar das wesentliche Resultat des LOH auf 10p14-p15 in Glioblastomen. Eine selektive Ausschaltung der Spleißvariante scheint nicht möglich, so dass für die Progression dieser Tumore ein LOH des gesamten *PFKFB3*-Genlocus notwendig ist. Der *PFKFB3*-LOH und die daraus resultierende niedrigere UBI2K4-Expression erhöhen offensichtlich die Malignität der Glioblastome, was eine kürzere Überlebenszeit der Patienten zur Folge hat.

7 Literaturverzeichnis

- Atsumi T, Chesney J, Metz C, Leng L, Donnelly S, Makita Z, Mitchell R, Bucala R.** 2002. High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (iPFK-2; PFKFB3) in human cancers. *Cancer Res* 62(20):5881-5887.
- Bando H, Atsumi T, Nishio T, Niwa H, Mishima S, Shimizu C, Yoshioka N, Bucala R, Koike T.** 2005. Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11(16):5784-5792.
- Bosca L, Mojena M, Ghysdael J, Rousseau GG, Hue L.** 1986. Expression of the v-src or v-fps oncogene increases fructose 2,6-bisphosphate in chick-embryo fibroblasts. Novel mechanism for the stimulation of glycolysis by retroviruses. *Biochem J* 236(2):595-599.
- Cancer Genome Atlas Research Network** 2008. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455(7216):1061-1068.
- Calvo MN, Bartrons R, Castaño E, Perales JC, Navarro-Sabaté A, Manzano A.** 2006. PFKFB3 gene silencing decreases glycolysis, induces cell-cycle delay and inhibits anchorage-independent growth in HeLa cells. *FEBS letters* 580(13):3308-3314.
- Camacho-Vanegas O, Narla G, Teixeira MS, DiFeo A, Misra A, Singh G, Chan AM, Friedman SL, Feuerstein BG, Martignetti JA.** 2007. Functional inactivation of the KLF6 tumor suppressor gene by loss of heterozygosity and increased alternative splicing in glioblastoma. *J Intern Cancer* 121(6):1390-1395.
- Chen C, Hyytinen ER, Sun X, Helin HJ, Koivisto PA, Frierson HF, Jr., Vessella RL, Dong JT.** 2003. Deletion, mutation, and loss of expression of KLF6 in human prostate cancer. *Am J Pathol* 162(4):1349-1354.
- Chen HK, Liu XQ, Lin J, Chen TY, Feng QS, Zeng YX.** 2002. [Mutation analysis of KLF6 gene in human nasopharyngeal carcinomas]. *Ai Zheng* 21(10):1047-1050.
- Chesney J.** 2006. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and tumor cell glycolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9(5):535-539.
- Chesney J, Mitchell R, Benigni F, Bacher M, Spiegel L, Al-Abed Y, Han JH, Metz C, Bucala R.** 1999. An inducible gene product for 6-phosphofructo-2-kinase with an AU-rich instability element: role in tumor cell glycolysis and the Warburg effect. *Proc Nat Acad Sci USA* 96(6):3047-3052.
- Cole MD, Mango SE.** 1990. Cis-acting determinants of c-myc mRNA stability. *Enzyme* 44(1-4):167-180.
- Couto SS.** 2011. The pathologist's slide reveals more than meets the eye: loss of heterozygosity and cancer biology. *Vet Pathol* 48(1):236-244.

- Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, Colella S, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H.** 2000. Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest* 80(1):65-72.
- Hamilton JA, Callaghan MJ, Sutherland RL, Watts CK.** 1997. Identification of PRG1, a novel progesterin-responsive gene with sequence homology to 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Mol Endocrinol* 11(4):490-502.
- Hartmann C, Hentschel B, Wick W, Capper D, Felsberg J, Simon M, Westphal M, Schackert G, Meyermann R, Pietsch T, Reifenberger G, Weller M, Löffler M, von Deimling A.** 2010. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol* 120(6):707-718.
- Hata N, Yoshimoto K, Yokoyama N, Mizoguchi M, Shono T, Guan Y, Tahira T, Kukita Y, Higasa K, Nagata S, Iwaki T, Sasaki T, Hayashi K.** 2006. Allelic losses of chromosome 10 in glioma tissues detected by quantitative single-strand conformation polymorphism analysis. *Clin Chem* 52(3):370-378.
- Ichimura K, Schmidt EE, Miyakawa A, Goike HM, Collins VP.** 1998. Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. *Gene Chromosome Canc* 22(1):9-15.
- Jeng Y-M, Hsu H-C.** 2003. KLF6, a putative tumor suppressor gene, is mutated in astrocytic gliomas. *Int J Cancer* 105(5):625-629.
- Kanu OO, Hughes B, Di C, Lin N, Fu J, Bigner DD, Yan H, Adamson C.** 2009. Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clin Med Oncol* 3:39-52.
- Kessler R, Bleichert F, Warnke J-P, Eschrich K.** 2008. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB3) is up-regulated in high-grade astrocytomas. *J Neurooncol* 86(3):257-264.
- Kessler R, Eschrich K.** 2001. Splice isoforms of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 87(2):190-195.
- Kimmelman AC, Ross DA, Liang BC.** 1996. Loss of heterozygosity of chromosome 10p in human gliomas. *Genomics* 34(2):250-254.
- Kleihues P, Ohgaki H.** 1999. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-oncology* 1(1):44-51.
- Kon H, Sonoda Y, Kumabe T, Yoshimoto T, Sekiya T, Murakami Y.** 1998. Structural and functional evidence for the presence of tumor suppressor genes on the short arm of chromosome 10 in human gliomas. *Oncogene* 16(2):257-263.
- Krebs HA.** 1972. The Pasteur effect and the relations between respiration and fermentation. *Essays Biochem* 8:1-34.

- Lee UE, Ghiassi-Nejad Z, Paris AJ, Yea S, Narla G, Walsh M, Friedman SL.** 2010. Tumor suppressor activity of KLF6 mediated by downregulation of the PTTG1 oncogene. *FEBS Lett* 584(5):1006-1010.
- Lohle PN, Wurzer HA, Seelen PJ, Kingma LM, Go KG.** 1998. Analysis of fluid in cysts accompanying various primary and metastatic brain tumours: proteins, lactate and pH. *Acta Neurochir (Wien)* 140(1):14-19.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P.** 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114(2):97-109.
- Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, DePinho RA.** 2001. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* 15(11):1311-1333.
- Mahlknecht U, Chesney J, Hoelzer D, Bucala R.** 2003. Cloning and chromosomal characterization of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 gene (PFKFB3, iPFK2). *Int J Oncol* 23(4):883-891.
- Manzano A, Rosa JL, Ventura F, Pérez JX, Nadal M, Estivill X, Ambrosio S, Gil J, Bartrons R.** 1998. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of a ubiquitously expressed human 6-phosphofructo-2-kinase/ fructose-2, 6-bisphosphatase gene (PFKFB3). *Cytogenet Cell Genet* 83(3-4):214-217.
- Minchenko A, Leshchinsky I, Opentanova I, Sang N, Srinivas V, Armstead V, Caro J.** 2002. Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene. Its possible role in the Warburg effect. *J Biol Chem* 277(8):6183-6187.
- Minchenko O, Opentanova I, Caro J.** 2003. Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression in vivo. *FEBS Lett* 554(3):264-270.
- Montanini L, Bissola L, Finocchiaro G.** 2004. KLF6 is not the major target of chromosome 10p losses in glioblastomas. *Int J Cancer* 111(4):640-641.
- Nakamura M, Watanabe T, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H.** 2001. Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis* 22(10):1715-1719.
- Narla G, Heath KE, Reeves HL, Li D, Giono LE, Kimmelman AC, Glucksman MJ, Narla J, Eng FJ, Chan AM, Ferrari AC, Martignetti JA, Friedman SL.** 2001. KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science* 294(5551):2563-2566.
- Nissler K, Petermann H, Wenz I, Brox D.** 1995. Fructose 2,6-bisphosphate metabolism in Ehrlich ascites tumour cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 121(12):739-745.
- Ohgaki H.** 2009. Epidemiology of brain tumors. *Methods Mol Biol* 472:323-342.
- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schuler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG,**

- Lutolf UM, Kleihues P.** 2004. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 64(19):6892-6899.
- Ohgaki H, Kleihues P.** 2005. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 109(1):93-108.
- Ohgaki H, Kleihues P.** 2009. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer science* 100(12):2235-2241.
- Okar DA, Lange AJ.** 1999. Fructose-2,6-bisphosphate and control of carbohydrate metabolism in eukaryotes. *Biofactors* 10(1):1-14.
- Okar DA, Manzano A, Navarro-Sabaté A, Riera L, Bartrons R, Lange AJ.** 2001. PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends Biochem Sci* 26(1):30-35.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA, Jr., Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW.** 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321(5897):1807-1812.
- Preusser M, de Ribaupierre S, Wöhrer A, Erridge SC, Hegi M, Weller M, Stupp R.** 2011. Current concepts and management of glioblastoma. *Ann Neurol* 70(1):9-21.
- Rasheed BK, McLendon RE, Friedman HS, Friedman AH, Fuchs HE, Bigner DD, Bigner SH.** 1995. Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene* 10(11):2243-2246.
- Reeves HL, Narla G, Ogunbiyi O, Haq AI, Katz A, Benzeno S, Hod E, Harpaz N, Goldberg S, Tal-Kremer S, Eng FJ, Arthur MJ, Martignetti JA, Friedman SL.** 2004. Kruppel-like factor 6 (KLF6) is a tumor-suppressor gene frequently inactivated in colorectal cancer. *Gastroenterology* 126(4):1090-1103.
- Rider MH, Bertrand L, Vertommen D, Michels PA, Rousseau GG, Hue L.** 2004. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochem J* 381(Pt 3):561-579.
- Riemenschneider MJ.** 2009. Molecular Neuropathology of Gliomas. *Int J Mol Sci* 10: 184-212.
- Riera L, Manzano A, Navarro-Sabaté A, Perales JC, Bartrons R.** 2002. Insulin induces PFKFB3 gene expression in HT29 human colon adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1589(2):89-92.
- Ruano Y, Mollejo M, Ribalta T, Fiaño C, Camacho FI, Gómez E, de Lope AR, Hernández-Moneo JL, Martínez P, Meléndez B.** 2006. Identification of novel candidate target genes in amplicons of Glioblastoma multiforme tumors detected by expression and CGH microarray profiling. *Mol Cancer* 5(39):39.

- Sakakibara R, Kato M, Okamura N, Nakagawa T, Komada Y, Tominaga N, Shimojo M, Fukasawa M.** 1997. Characterization of a human placental fructose-6-phosphate, 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J Biochem* 122(1):122-128.
- Telang S, Yalcin A, Clem AL, Bucala R, Lane AN, Eaton JW, Chesney J.** 2006. Ras transformation requires metabolic control by 6-phosphofructo-2-kinase. *Oncogene* 25(55):7225-7234.
- Voesten AM, Bijleveld EH, Westerveld A, Hulsebos TJ.** 1997. Fine mapping of a region of common deletion on chromosome arm 10p in human glioma. *Gene Chromosome Canc* 20(2):167-172.
- Vranová V, Necesalová E, Kuglík P, Cejpek P, Pesáková M, Budínská E, Relichová J, Veselská R.** 2007. Screening of genomic imbalances in glioblastoma multiforme using high-resolution comparative genomic hybridization. *Oncol Rep* 17(2):457-464.
- Warburg O.** 1956. On the origin of cancer cells. *Science* 1956(123):309-314.
- Watanabe F, Furuya E.** 1999. Tissue-specific alternative splicing of rat brain fructose 6-phosphate 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. *FEBS Lett* 458(3):304-308.
- Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H.** 1996. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 6(3):217-223; discussion 223-214.
- Westphal M, Lamszus K.** 2011. The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. *Nat Rev Neurosci* 12(9):495-508.
- Yalcin A, Clem BF, Simmons A, Lane A, Nelson K, Clem AL, Brock E, Siow D, Wattenberg B, Telang S, Chesney J.** 2009. Nuclear targeting of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) increases proliferation via cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem* 284(36):24223-24232.
- Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD.** 2009. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 360(8):765-773.
- Yin D, Komatsu N, Miller CW, Chumakov AM, Marschesky A, McKenna R, Black KL, Koeffler HP.** 2007. KLF6: mutational analysis and effect on cancer cell proliferation. *International journal of oncology* 30(1):65-72.
- Zhou YX, Wang JX, Feng M, Sun CM, Sun T, Chen GL, Du ZW.** 2011. Analysis of Isocitrate Dehydrogenase 1 Mutation in 97 Patients with Glioma. *J Mol Neurosci*.
- Zscharnack K, Kessler R, Bleichert F, Warnke JP, Eschrich K.** 2009. The PFKFB3 splice variant UBI2K4 is downregulated in high-grade astrocytomas and impedes the growth of U87 glioblastoma cells. *Neuropathol Appl Neurobiol* 35(6):566-578.

8 Anlagen

8.1 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....

Datum Unterschrift

8.2 Curriculum Vitae

Name: Michael Fleischer

Adresse: Keesburgstraße 13

97074 Würzburg

Geboren 08.01.1982

Geburtsort: Stuttgart

Familienstand: ledig

Beruf

seit 03/2012 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für klinische Neurobiologie,
Universitätsklinikum Würzburg, im Rahmen einer Rotationsstelle an
der Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Würzburg

Forschungsprojekt: „Anpassungsvorgänge in Neuronen auf
Tiefenhirnstimulation“

Ausbildung

10.11.2011 2. Ärztliche Prüfung

12.09.2007 1. Ärztlichen Prüfung

10/2006 Studium der Humanmedizin, Universität Leipzig

10/2004 Studium der Zahnmedizin, Universität Leipzig

25.6.2002 Abitur

1994-2002 Gymnasium

1992-1994 Realschule

1988-1992 Grundschule

PJ-Teritale

- | | |
|------------|---|
| 3. Tertial | Klinik für Innere Medizin, St. Elisabeth Krankenhaus Leipzig,
Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Leipzig |
| 2. Tertial | Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie,
Universitätsklinikum Leipzig, |
| 1. Tertial | Allg. Chirurgie, Universitätskrankenhaus Virgen Macarena, Sevilla,
Spanien |

Famulaturen

- | | |
|---------|--|
| 03/2010 | Neurologie, Gesundheitszentrum Lohr, Klinikum Main-Spessart,
Lohr a. M. |
| 09/2009 | Zentrale Notaufnahme, Mater Misericordiae University Hospital,
Dublin, Irland |
| 09/2008 | Gastroenterologie und Infektiologie, Klinik am Eichert, Göppingen |
| 08/2008 | Unfallchirurgie, Katharinenhospital, Stuttgart Hämato-Onkologie, |
| 02/2008 | Institut Jules Bordet, Brüssel, Belgien |

Wahlfächer

- | | |
|-----------|---|
| Klinik | „Computerassisted Surgery“, ICCAS, Universität Leipzig |
| Vorklinik | „Molekularbiologie in der Medizinischen Forschung, Diagnostik und
Therapie“, Institut für Biochemie, Universität Leipzig |

Anstellungen

- | | |
|-----------|--|
| 2007-2011 | Betreuung ambulant operierter Patienten, Praxisklinik „Am
Johannisplatz“, Pflegedienst, D.A.S.D., Der Soziale Dienst GmbH,
Leipzig |
|-----------|--|

2006-2007	Studentische Hilfskraft, Fachbereich hämatologische Onkologie, Unternehmensgruppe
2004-2006	Krankenhaus St. Georg, Leipzig
08-12/2003	Betreuung eines tetraparetischen Patienten im häuslichen Bereich Pflegehelfer, Kardiologie, Klinik am Eichert, Göppingen
1998-2003	Musikalische Begleitung von Gottesdiensten in verschiedener Gemeinden

Zivildienst

2002-2003	Klinik für Neurologie, Neurophysiologie und Frührehabilitation, Fachklinik für Psychiatrie und Neurologie Christophsbad, Göppingen
-----------	---

Weiterer Auslandsaufenthalt

01-03/2004	„Work and travel“ – Gastronomieservice, Salisbury, England
------------	--

Sprachen

Englisch: sehr gut, „Englisch für Mediziner“ (UNICert III)

Französisch: gut

Spanisch: ausgebaute Grundkenntnisse (Niveau B1)

Zusatzqualifikation

Nebenamtlicher Organist (C-Organist, evangelisch)

EKG Kurs, Ultraschall-Kurs (DEGUM zertifiziert)

Mentoring und Coaching Programm „MenCo“, Universität Leipzig

8.3 Publikationen

12 / 2011 “LOH on 10p14-p15 targets the PFKFB3 gene locus in human glioblastomas”, **Fleischer M**, Kessler R, Klammer A, Warnke JP, Eschrich K, Genes, Chromosomes and Cancer, 2011 Dec, 50 (12), 1010-20.

09 / 2011 "Fatigue in patients with sarcoidosis, compared with the general population", Hinz A, **Fleischer M**, Brähler E, Wirtz H, Bosse-Henck A, Gen Hosp Psychiatry, 2011 Sept, 33 (5) 462-8.

“Predictors of fatigue in patients with sarcoidosis”, **Fleischer M**, Hinz A, Brähler E, Wirtz H, Bosse-Henck A.; under revision.

Poster

12 / 2008 “Loss of heterozygosity on chromosome 10p reduces the PFKFB3 protein level in glioblastoma”, **Fleischer M**, Kessler R, Eschrich K, Poster, 7th Leipziger Research Festival.

8.4 Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Klaus Eschrich für die freundliche Überlassung des Themas.

Frau Dr. Kessler danke ich für die intensive, tatkräftige Betreuung im Labor und der Unterstützung im iterativen Prozess der Veröffentlichung.

Herzlichen Dank an die beiden Labortechnischen Assistentinnen Frau Andrea Böhme und Frau Helga Stache für manchen guten Tipp und Ratschlag bei methodischen Schwierigkeiten.

Beatrice für viele Diskussionen, Ermutigung und Unterstützung.